

LUCIANA COELHO DE MOURA

**INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM
Eucalyptus spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do
título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M929i
2016 Moura, Luciana Coelho de, 1986-
 Indução de embriões somáticos em *Eucalyptus* spp. /
Luciana Coelho de Moura. – Viçosa, MG, 2016.
 ix, 83f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aloísio Xavier.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Propagação in vitro. 2. Micropropagação.
3. Embriogênese somática. 4. Genética florestal.
5. Melhoramento genético. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Florestal. Programa de
Pós-graduação em Ciência Florestal. II. Título.

CDD 22 ed. 634.973766

LUCIANA COELHO DE MOURA

**INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM
Eucalyptus spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do
título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 27 de setembro de 2016.

Elizabete Keiko Takahashi

Ana Cláudia Ferreira da Cruz

Eduardo Euclides de Lima e Borges
(Coorientador)

Wagner Campos Otoni
(Coorientador)

Aloisio Xavier
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, força e clareza para vencer mais essa grande etapa da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela realização do curso de doutorado e deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao trabalho desenvolvido.

Ao meu orientador Aloisio Xavier pelos ensinamentos e confiança e aos meus coorientadores Wagner Campos Otoni, Miranda Titon e Eduardo Euclides de Lima e Borges por todas as contribuições tanto ao trabalho como à minha formação acadêmica.

Aos membros da banca examinadora Ana Cláudia Ferreira da Cruz e Elizabete Keiko Takahashi, e ao pesquisador Marcos Deon Vilela de Resende, pelas valiosas sugestões/críticas dadas aos trabalhos.

Aos meus pais, Cláudia e Jovani, eternos apoiadores das minhas decisões, por não terem medido esforços para a minha formação; à minha avó Corália e às minhas irmãs Patrícia e Cristiane pelo valioso apoio.

Ao grupo de silvicultura, pela excelente convivência, em especial Ricardo e Eliane, por estarem sempre presentes nos momentos de trabalho e de descontração; aos amigos do LCTII, em especial a Helen, por estarem sempre disponíveis a ajudar ou compartilhar conhecimentos; às companheiras de república; aos amigos distantes, em especial Cris e Vinícius, pela verdadeira amizade e por se manterem presentes em minha vida.

Aos colegas de laboratório Elyabe, Andréa e Ana Cláudia pelo auxílio durante os experimentos e aos professores da UFV e da UFVJM, pelos conhecimentos adquiridos e pela agradável convivência.

A todos aqueles que não foram mencionados, mas colaboraram de alguma forma, para o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

LUCIANA COELHO DE MOURA, filha de Jovani Márcio Coelho de Moura e de Cláudia Lúcia Lopes Coelho, nasceu em 22 de novembro de 1986, em Diamantina, Minas Gerais.

Concluiu o 1º grau em 2001, e o 2º grau em 2004, no Colégio Tiradentes da Polícia Militar de Minas Gerais (CTPMMG), em Diamantina, Minas Gerais.

Em agosto de 2005, ingressou no Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal dos Vales Jequitinhona e Mucuri (UFVJM), em Diamantina, Minas Gerais, concluindo o curso em dezembro de 2009.

Em março de 2010, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal dos Vales Jequitinhona e Mucuri (UFVJM), concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de Magister Scientiae em 28 de fevereiro de 2012.

Em abril de 2013, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de Doctor Scientiae em 27 de setembro de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
EFEITO DO TIPO DE EXPLANTE, DO MEIO DE CULTURA E DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO DICAMBA E PICLORAM NA INDUÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	6
1. INTRODUÇÃO	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1. Material vegetal	7
2.2. Indução de embriões somáticos	8
2.3. Proliferação de embriões somáticos.....	9
2.4. Coleta e análise de dados	9
2.5. Caracterização anatômica	10
3. RESULTADOS	10
3.1. Indução de embriões somáticos	10
3.2. Proliferação de embriões somáticos.....	13
4. DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÕES	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
EFEITO DO CÁLCIO, BAP E PUTRESCINA NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	22
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Material vegetal	24
2.2. Efeito do cálcio da indução de embriões somáticos.....	25
2.3. Efeito de BAP e putrescina na indução de embriões somáticos.....	25
2.4. Coleta e análise de dados	26
2.5. Caracterização anatômica	26
3. RESULTADOS	27
3.1. Efeito do cálcio na indução de embriões somáticos.....	27
3.2. Efeito do BAP e putrescina na indução de embriões somáticos.....	30
4. DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÕES	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
EFEITO DO PULSO DE AUXINA NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	42
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	44

2.1. Material vegetal	44
2.2. Indução de embriões somáticos	44
2.3. Análise dos dados	46
3. RESULTADOS	47
3.1. Experimento 1	47
3.2. Experimento 2	50
4. DISCUSSÃO	52
5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

GENETIC CONTROL AND SELECTION FOR IN VITRO PROPAGATION CHARACTERISTICS OF *Eucalyptus* HYBRID CLONES..... 62

1. INTRODUCTION	62
2. MATERIALS AND METHODS	64
2.1. Induction of somatic embryogenesis and data collection	64
2.2. Estimates of genetic parameters and correlations	66
3. RESULTS	66
3.1. Structural analysis	66
3.2. Genetic control of the traits	67
3.3. Estimation of genetic parameters	67
3.4. Genetic correlations	67
3.5. Ranking of the genotypes and auxins	70
4. DISCUSSION	71
4.1. Genetic control and parameters	71
4.2. Genetic correlations	73
4.3. Ranking of the genotypes and auxins	74
5. CONCLUSIONS	74
6. REFERENCES	75

CONCLUSÃO GERAL 82

RESUMO

MOURA, Luciana Coelho de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2016. **Indução de embriões somáticos em *Eucalyptus* spp.** Orientador: Aloisio Xavier. Coorientadores: Eduardo Euclides de Lima e Borges, Miranda Titon e Wagner Campos Otoni.

O objetivo do presente estudo foi determinar o conjunto de fatores que interferem nos estágios iniciais da embriogênese somática de *Eucalyptus*, tendo por base os seguintes objetivos específicos: 1) verificar o efeito de tipos de explantes, tipos e concentrações de auxinas na indução; tipos de meio de cultura e concentrações de auxina na proliferação de embriões somáticos em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; 2) verificar o efeito de concentrações e fontes de cálcio; concentrações e tempo de efeito de citocinina e poliamina, na indução e desenvolvimento de embriões somáticos em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; 3) verificar o efeito do pulso de auxina em diferentes estágios de desenvolvimento de embriões somáticos em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; 4) estimar a correlação genética entre as características de indução de embriões somáticos, além de estudar o controle genético relacionado às mesmas a fim de averiguar sua utilidade na seleção de genótipos com competência embriogênica de clones híbridos de *Eucalyptus*. A indução de pró-embriões somáticos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* pode ser obtida utilizando sementes ou cotilédones como fonte de explantes, e dicamba e picloram como reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura. Para a obtenção de médias mais altas no percentual de indução de pró-embriões somáticos deve-se utilizar picloram e cotilédones como fontes de explantes. Para a proliferação de pró-embriões somáticos secundários, pode-se utilizar meio de cultura líquido adicionado de picloram. O meio de cultura JADS proporcionou maior calogênese em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, quando comparado ao meio de cultura MS. A adição de 28,36 μM de putrescina ao meio de cultura proporcionou maior percentual de indução de embriogênese somática nesses mesmos explantes. O número de pró-embriões somáticos formados por explante foi superior quando se acrescentou BAP e principalmente putrescina ao meio de cultura se comparado com o meio contendo somente picloram. Acréscimos na concentração de cálcio nos meios MS e JADS não proporcionam melhorias no que se refere à indução de embriogênese somática. Tratamentos com pulso da auxina picloram (207,02 μM) podem ser utilizados como fonte de estresse inicial para aquisição da competência

embriogênica em explantes cotiledonares em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. A indução média de calos embriogênicos foi superior no intervalo de dois dias de pulso de auxina, em relação aos outros dois intervalos testados tanto aos 30 dias, como aos 37 e 44 dias de avaliação. A oxidação dos explantes, quando colocados em meio de indução, pode ser considerada um indício de formação de calos embriogênicos. A presença de pectinas em regiões periféricas de pró-embriões somáticos pode ser vista como marcador de embriogênese somática em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. A característica porcentual de pró-embriões somáticos apresenta controle genético. A correlação genética alta e positiva entre calogênese em média intensidade e indução de pró-embriões somáticos indica que a seleção para a primeira característica resulta em consistentes respostas na segunda. Os híbridos triplos utilizados no presente estudo apresentaram maiores valores genéticos para porcentual de indução de pró-embriões somáticos, quando comparados aos demais híbridos estudados, indicando maior facilidade na indução de embriogênese somática para essa espécie.

ABSTRACT

MOURA, Luciana Coelho de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2016. **Induction of somatic embryos in *Eucalyptus* spp.** Adviser: Aloisio Xavier. Co-advisers: Eduardo Euclides de Lima e Borges, Miranda Titon and Wagner Campos Otoni.

The objective of this study was to determine the set of factors that interfere in the early stages of somatic embryogenesis of *Eucalyptus*, and by the following specific objectives based on: 1) verify the effect of explants types, types and concentrations of auxin in the induction; types of culture media and auxin concentrations on the proliferation of somatic embryos in juvenile explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; 2) verify the effect of concentrations and sources of calcium; and cytokinin and polyamine concentrations and effect of time, in the induction and development of somatic embryos in juvenile explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; 3) verify the effect of auxin pulse at different stages of development of embryos in juvenile explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; 4) estimate the genetic correlation between the somatic embryo induction characteristics, in addition to studying the genetic control related to them to ascertain its usefulness in the selection of genotypes with embryogenic competence of hybrid clones of *Eucalyptus*. The induction of somatic pro-embryos of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. can be obtained using cotyledon or seed as a source of explants, dicamba and picloram as growth regulators added to the culture medium. However, to obtain higher means the percentage of somatic pro-embryos induction should be used picloram and cotyledon as source of explants. For the proliferation of secondary somatic pro-embryos may be used a liquid culture medium added picloram. The JADS culture medium showed higher callus formation in cotyledon explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* when compared to MS medium. Addition of 28.36 μM of putrescine to the culture medium provided a higher percentage of somatic embryogenesis induction in these same explants. The number of somatic pro-embryos formed per explant was higher when added BAP and mainly putrescine to the culture medium compared to medium containing only picloram. Increases in calcium concentration in the MS and JADS media does not provide improvements with regard to the induction of somatic embryogenesis. Treatments with pulse auxin picloram (207.02 μM) can be used as a source of initial stress for the acquisition of embryogenic competence in cotyledons and *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. The average of embryogenic callus induction was better in the interval of two days auxin pulse of the two other ranges tested both after 30

days and after 37 and 44 days of assessment. Oxidation of the explants, when placed on induction medium, can be considered a sign of formation of embryogenic callus. The presence of pectin in peripheral regions of somatic pro-embryos can be seen as a marker of somatic embryogenesis in cotyledon explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. The characteristic percentage of somatic pro-embryos has genetic control. High and positive genetic correlation between callus formation in average intensity and somatic pro-embryos induction indicates that selection for the first feature should lead to consistent responses in the second. Tree-cross hybrids used in this study showed higher genetic values of somatic pro-embryos induction when compared to other hybrids studied, indicating greater ease in inducing somatic embryogenesis in this species.

INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, tem-se assistido a um constante aumento no interesse pela silvicultura clonal, decorrente das vantagens como possibilidade de contornar problemas de determinadas doenças, com a seleção de clones resistentes, ou ainda contornar problemas com a heterogeneidade e produtividades dos plantios florestais (XAVIER et al., 2013). Dentre as técnicas de propagação vegetativa utilizadas nesse processo de clonagem, têm-se observado uma tendência evolutiva nos processos de produção massal de mudas clonais do gênero *Eucalyptus*; inicialmente, os propágulos eram coletados no campo e propagados através da estaquia; essa técnica foi aprimorada com o surgimento da miniestaquia e a manutenção de um minijardim para coleta de propágulos em viveiro; e, posteriormente, observou-se o incremento da participação da biotecnologia, mais especificamente da micropropagação, a cada etapa do avanço da pesquisa e implementação em nível operacional (XAVIER et al., 2013).

Apesar das técnicas de micropropagação por meio de gemas axilares proporcionarem altas taxas de propagação de plantas de *Eucalyptus*, os casos de sucesso em outras espécies de árvores indicam que as taxas de multiplicação podem ser potencialmente maiores através da embriogênese somática (PARK et al., 2006).

A embriogênese somática permite a produção em larga escala de plantas, possibilitando reduzir significativamente o custo por unidade de muda produzida (PINTO et al., 2009), além de ser a única técnica de propagação vegetativa que produz mudas clonais com raízes pivotantes. Em condições apropriadas, os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada, com elevado grau de uniformização clonal e conformidade genética, o que torna a embriogênese somática uma importante técnica de propagação de plantas em programas de melhoramento genético (VON ARNOLD et al., 2002; CHEN et al., 2010; LU et al., 2011; PINTO et al., 2011; SIVANESAN et al., 2011).

A técnica da embriogênese somática possui outras aplicações, como: produção de sementes sintéticas; conservação de germoplasma, por criopreservação, proporcionando flexibilidade ao programa de melhoramento, dadas mudança de objetivos e/ou condições ambientais; manipulação genética, pelo desenvolvimento de plantas transgênicas (BONGA; VON ADERKAS, 1992; HÖGBERG et al., 1998; PARK et al., 1998; QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006; BAKHSHAIE et al., 2010; CAPELO et al.,

2010; KHAN et al., 2010; KONIECZNY et al., 2010; MING-HUA; SEM-RONG, 2010); rejuvenescimento de clones com características de interesse, mas que possuem desvantagens como baixa porcentagem de enraizamento ou crescimento plagiotrópico das mudas (XAVIER et al., 2013).

O processo de embriogênese somática inicia-se com a etapa da indução embriogênica de uma única célula somática ou pequeno grupo de células somáticas, resultando em uma estrutura bipolar, contendo meristemas apicais aéreos e radiculares, diferenciados em pólos opostos simultaneamente (KARAMI et al., 2009;. ROCHA; DORNELAS, 2013). Essas células passam por estágios similares àqueles observados na embriogênese zigótica, caracterizando-se como uma estrutura sem nenhuma conexão vascular com o tecido materno (VON ARNOLD et al., 2002).

Por se tratar de um mecanismo complexo, diversos fatores influenciam na etapa de indução de embriões somáticos. Alguns desses, como juvenilidade do tecido materno, níveis hormonais e pH internos e externos à célula, principalmente a variação temporal e espacial de auxinas (FEHÉR, 2015), tipo e composição do meio de cultura, condições de incubação e o efeito genético (CORRÊA et al., 2015), dentre outros ainda não elucidados, interferem nos diversos estádios de formação completa do embrião somático. Em condições de laboratório, pode-se estudar e determinar o conjunto de fatores manipuláveis necessário à indução de embriões somáticos.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi determinar o conjunto de fatores que interferem nos estádios iniciais da embriogênese somática de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, tendo por base os seguintes objetivos específicos: 1) verificar o efeito de tipos de explantes, tipos e concentrações de auxinas na indução; tipos de meio de cultura e concentrações de auxina na proliferação de embriões somáticos em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; 2) verificar o efeito de concentrações e fontes de cálcio; concentrações e tempo de efeito de citocinina e poliamina, na indução e desenvolvimento de embriões somáticos em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; 3) verificar o efeito do pulso de auxina em diferentes estágios de desenvolvimento de embriões somáticos em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; 4) estimar a correlação genética entre as características de indução de embriões somáticos, além de estudar o controle genético relacionado às mesmas a fim de averiguar sua utilidade na seleção de genótipos com competência embriogênica de clones híbridos de *Eucalyptus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKSHAIE, M.; BABALAR, M.; MIRMASOUMI, M.; KHALIGHI, A. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss., na endangered species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.102, p.229-235, 2010.

BONGA, J.M., VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236p.

CAPELO, A.M.; SILVA, S.; BRITO, G.; SANTOS, C. Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.103, p.237-242, 2010.

CHEN, A.H.; YANG, J.L.; NIU, Y.D.; YANG, C.P.; LIU, G.F.; YU, C.Y.; LI, C.H. High-frequency somatic embryogenesis from germinated zygotic embryos of *Schisandra chinensis* and evaluation of the effects of medium strength, sucrose, GA₃, and BA on somatic embryo development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.102, p.357-364, 2010.

CORRÊA, T. R.; MOTOYKE, S. Y.; COSER, S. M.; SILVEIRA, G.; RESENDE, M. D. V.; CHIA, G.S. Estimation of genetic parameters for in vitro oil palm characteristics (*Elaeis guineensi* sJacq.) and selection of genotypes for cloning capacity and oil yield. **Industral Crops and Products**, n. 77, p. 1033-1038, 2015.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress –induced remodeling of plant cell fate. **Biochim Biophys Acta. – Gene Regulatory Mechanisms**, v.1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

HÖGBERG, K-A.; EKBERG, I.; NORELL, L.; VON ARNOLD, S. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. **Canadian Journal Forest Research**, v. 28, p.1536-1545, 1998.

KARAMI, O; AGHAVAISI, B; POUR, A. M. Molecular aspects of somatic-to embryogenic transition in plants. **Journal of Chemical Biology**, n.2, p. 177–190, 2009.

KHAN, T.; REDDY, V.S.; LEELAVATHI, S. High-frequency regeneration via somatic embryogenesis of an elite recalcitrant cotton genotype (*Gossypium hirsutum* L.) and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.101, p.323-330, 2010.

KONIECZNY, R.; PILARSKA, M.; TULEJA, M.; SALAJ, T.; ILNICKI, T. Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryos of *Trifolium nigrescens* (Viv.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.100, p.123-130, 2010.

LU, J.; VAHALA, J.; PAPPINEN, A. Involvement of ethylene in somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p.1-9, 2011.

MING-HUA, Y.; SEN-RONG, H. A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.101, p.349-358, 2010.

PARK, Y-S.; BARRET, J. D.; BONGA, J. M. Applications of somatic embryogenesis in highvalue clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 34, p. 231-239, 1998.

PARK, Y-S.; LELU-WALTER, M. A.; HARVENGT, L.; TRONTIN, J. F.; MACEACHRON, I. KLIMASZEWSKA, K.; BONGA, J. M. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 87- 101, 2006.

PINTO, D.L.P.; ALMEIDA, A.M.R.; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.521-530, 2011.

PINTO, G.; PARK, Y-S.; LOUREIRO, J.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SILVA, S.; SANTOS, C. Somatic embryogenesis in Eucalyptus – an update to 2009. **Applications of Plant Biotechnology**, p. 67-88, 2009.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.86, p.285-301, 2006.

ROCHA, D. I; DORNELAS, M. C. Molecular overview on plant somatic embryogenesis. **CAB Reviews**, n. 8, p. 1–17, 2013.

SIVANESAN, I.; LIM, M.Y.; JEONG, B.R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and petiole explants of *Campanula punctata* Lam. var. *rubriflora* Makino. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.365-369, 2011.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.233-249, 2002.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2013, 272 p.

**EFEITO DO TIPO DE EXPLANTE, DO MEIO DE CULTURA E DOS
REGULADORES DE CRESCIMENTO DICAMBA E PICLORAM NA INDUÇÃO E
PROLIFERAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM *Eucalyptus grandis* x *E.
urophylla***

Resumo - O objetivo do presente estudo foi testar o efeito do tipo de explante e concentrações de auxinas na indução, bem como o efeito do meio de cultura e de concentrações de auxina na proliferação de embriões somáticos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Sementes e cotilédones foram utilizados como explantes e inoculados em meio de cultura de indução contendo 1,13; 2,26; 3,39 e 4,52 μM de dicamba ou 4,14; 10,35; 20,71 e 31,06 μM de picloram. Calos embriogênicos induzidos nos tratamentos com picloram foram utilizados como explantes e inoculados em meio semissólido ou líquido contendo 4,14; 10,35; 20,71 e 31,06 μM de picloram e mantendo-se a origem dos calos embriogênicos (sementes ou cotilédones) e a concentração de picloram em que os mesmos estavam na fase de indução. A indução de pró-embriões somáticos em material vegetal juvenil de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* pode ser realizada utilizando-se sementes ou cotilédones como fonte de explantes, e dicamba e picloram como reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura. O uso de cotilédones como fonte de explantes e picloram adicionado ao meio de cultura resultou em maiores médias na indução de pró-embriões somáticos, quando comparadas com o uso de sementes. A proliferação de pró-embriões somáticos secundários pode ser obtida utilizando meio líquido adicionado de picloram.

Palavras-chave: propagação in vitro, micropropagação, embriogênese somática.

1. Introdução

Sistemas de regeneração de plantas in vitro têm sido muito utilizados em métodos de melhoramento e biotecnologia como na micropropagação, na produção de haplóides, na produção de plantas livres de doenças, no rejuvenescimento e na transformação genética (RAI; SHEKHAWAT 2014; US-CAMAS et al., 2014). A embriogênese somática tem suas aplicações potencializadas quando há ocorrência de embriogênese somática secundária, que é a produção de novos embriões a partir de embriões somáticos pré-existentes. Os sistemas de calos embriogênicos são altamente

regeneráveis e podem gerar grande número de propágulos e se manter por longos períodos.

Desde décadas passadas, alguns autores já demonstravam interesse pela embriogênese somática para diversas espécies do gênero *Eucalyptus*. Porém, as baixas taxas de iniciação embriogênica observadas em espécies de *Eucalyptus* (PINTO et al, 2002; MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1995), a incapacidade dos embriões somáticos em atingir a plena maturação e germinar (MURALIDHARAN et al., 1989; MURALIDHARAN; MASCARENHA, 1995) e a ocorrência de variação somaclonal, (MERKLE, 1995; JAIN, 2006) podem limitar ou inviabilizar a adoção da embriogênese somática como técnica comercial na propagação clonal, sendo esses entraves limitadores do número de genótipos utilizados.

Fatores como idade ontogenética do tecido materno, níveis hormonais, tipo de meio de cultura utilizado, dentre outros, interferem nas diversas fases de formação do embrião somático. A presença de altas concentrações de auxina, por exemplo, tem sido apontada como gatilho inicial na aquisição da competência embriogênica (FEHÉR, 2015). Titon et al. (2007) observaram estruturas semelhantes a embriões somáticos induzidos em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* em tratamentos com as auxinas dicamba e picloram. A composição do meio de cultura assim como a facilidade de assimilação desses compostos com a presença ou não de um agente gelificante (ZIV, 1995) podem interferir no desenvolvimento das estruturas embrionárias.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi testar o efeito de tipo de explante e de concentrações de auxinas na indução, bem como o efeito do meio de cultura e concentrações de auxina na proliferação de embriões somáticos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Para a obtenção dos dois tipos de explantes (semente e cotilédone) utilizados no presente trabalho, foram utilizadas sementes híbridas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* provenientes da APS 13 da empresa Gerdau, localizada em Três Marias-MG, coletadas em janeiro de 2011. Para desinfestação das sementes utilizadas na experimentação, essas foram previamente lavadas em água corrente e, em câmara de

fluxo laminar horizontal, imersas em álcool 70% durante 30 segundos e em seguida em hipoclorito de sódio 5% durante 15 minutos, sendo adicionado 4 gotas de detergente tween 20 a cada 100 mL de solução. Após o tratamento de desinfestação, as sementes foram lavadas seis vezes em água autoclavada. Para obtenção dos cotilédones, as sementes já desinfestadas foram colocadas para germinação em placas de Petri estéreis descartáveis (90 x 15 mm) contendo 30 mL de meio de cultura semissólido previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos. O meio de cultura utilizado continha 50% dos sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 1,5% de sacarose, 50 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 2,8 g.L⁻¹ de Phytigel® e pH ajustado para 5,8 ± 0,01. As sementes foram mantidas durante 7 a 10 dias em sala de cultivo a 24 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 33 μmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro (LI-COR®, LI-250A Light Meter), proporcionada por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40W, Osram, Brasil).

2.2. Indução de embriões somáticos

Sementes e cotilédones foram utilizados como explantes e inoculados em placas de Petri estéreis descartáveis (60 x 15 mm) contendo 15 mL de meio® MS com 100% dos sais e vitaminas, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 3% de sacarose, 2,8 g.L⁻¹ de Phytigel® e pH ajustado para 5,8 ± 0,01, previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos. Foram adicionados ao meio de cultura 1,13; 2,26; 3,39 e 4,52 μM de ácido 3,6 dicloro-o-anisico (dicamba) ou 4,14; 10,35; 20,71 e 31,06 μM de ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram), e um tratamento sem adição de reguladores de crescimento (controle). Os explantes foram mantidos em sala de cultura no escuro sob temperatura de 24±1 °C.

Para as análises estatísticas, consideraram-se dois experimentos distintos, um com as concentrações de dicamba e outro com concentrações de picloram. Para ambos, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5, constituído por dois tipos de explantes (sementes e cotilédones) cinco concentrações de reguladores de crescimento (dicamba + controle ou picloram + controle), com 6 repetições e 10 explantes/parcela.

2.3. Proliferação de embriões somáticos

Calos embriogênicos induzidos nos tratamentos com picloram foram utilizados como explantes e inoculados em placas de Petri estéreis descartáveis (60 x 15 mm), contendo 15 mL de meio semissólido ou em erlenmeyers contendo 30 mL de meio líquido MS com 100% dos sais e vitaminas, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 3% de sacarose, 2,8 g.L⁻¹ de Phytigel® (para o meio semissólido) e pH ajustado para 5,8 ± 0,01, previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos. Foram adicionados ao meio de cultura 4,14; 10,35; 20,71 e 31,06 µM de picloram, mantendo-se a origem dos calos embriogênicos (sementes ou cotilédones) e a concentração de picloram em que os mesmos estavam na fase de indução.

Os explantes foram mantidos em sala de cultura no escuro sob temperatura de 24±1 °C e agitação de 50 rpm (meio líquido), para manter a oxigenação no meio de cultura.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4 (duas origens de explantes e quatro concentrações de picloram). Considerou-se dois experimentos: o primeiro em meio semissólido que conteve 4 a 10 repetições e 1 calo embriogênico por parcela e, o segundo, em meio líquido, que conteve 5 repetições e 2 calos embriogênicos por parcela.

2.4. Coleta e análise de dados

Foram avaliados, aos 40 dias, o percentual de pró-embriões somáticos (%PES), de calogênese (%CAL) e de rizogênese (%RIZ) formados por explante para cada tratamento no experimento de indução de embriões, bem como o número de pró-embriões somáticos secundários (PESS) formados em cada explante em meio semissólido, para o experimento de proliferação.

Para todas as análises dos dados obtidos, utilizou-se o programa estatístico R, versão 3.0.3 (R Core Team, 2014) e o pacote ExpDes (Experimental Designs) (FERREIRA et al., 2013), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade quando necessário.

Para todos os experimentos, foi realizada uma análise descritiva contemplando cor, forma, aspecto e origem dos PES ou PESS, documentação fotográfica in vivo

realizada através de uma câmera digital (Olympus E-330) acoplada a um microscópio estetoscópio binocular e coleta de material vegetal para análise estrutural.

A análise descritiva no experimento de proliferação utilizando o meio líquido foi realizada aos 40 e 80 dias. Ainda neste experimento, PESS foram coletadas aos 80 dias, compactadas in vivo, coradas com azul de evans 0,5% durante 3 minutos e carmim acético 0,1% durante outros 3 minutos e fotografadas em fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

2.5. Caracterização anatômica

Para a caracterização anatômica, foram coletados calos embriogênicos de todos os tratamentos realizados nos experimentos aos 40 dias para o experimento de indução e aos 40 e 80 dias para o experimento de proliferação.

As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído (KARNOVSKY, 1965, modificado – 2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 3% sacarose, CaCl_2 5 μM em tampão cacodilato 0,1 M pH 6,8), por no mínimo uma semana, desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historresin, Leica). Para a obtenção de cortes transversais e longitudinais com 5 μm utilizou-se micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2255 – Leica) equipado com navalha de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina a pH 4,4 (O'BRIEN; McCULLY, 1981) por 10 minutos, e as lâminas montadas com resina sintética (Permount). As imagens foram obtidas em fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

3. Resultados

3.1. Indução de embriões somáticos

Com base nos resultados obtidos nas avaliações na condição in vitro, foram encontradas diferenças entre os fatores (tipo de explante e concentração de dicamba) para todas as características avaliadas (%PES, %CAL e %RIZ). Para o percentual de pró-embriões somáticos (%PES), o uso do explante cotilédone proporcionou maior média em relação ao explante semente na concentração de 3,4 μM de dicamba (Figura 1A). Para o explante cotilédone, observa-se uma tendência crescente do %PES a medida em

que se aumenta a concentração de dicamba, sendo as concentrações de 3,4 e 4,5 μM superiores às concentrações de 0,0 e 1,1 μM (Figura 1A). Para o explante cotilédone, observa-se maiores médias de %PES na concentração de 3,4 μM , seguida da concentração de 4,5 μM (Figura 1A).

Com a análise desses resultados, pode-se concluir que as concentrações de dicamba utilizadas no presente trabalho foram baixas no intuito de alcançar indução máxima de pró-embriões somáticos, no que se refere ao explante semente. Para o explante cotilédone, também seria interessante repetir o experimento utilizando concentração mais altas dessa auxina.

Para o explante semente, o percentual de calogênese (%CAL) permaneceu estável à medida que se aumentou a concentração do dicamba (Figura 1B). Para o explante cotilédone, houve aumento do %CAL acompanhando o aumento da concentração de dicamba, sendo a concentração de 4,5 μM a que proporcionou maiores médias de %CAL (Figura 1B). Para as concentrações de 3,4 e 4,5 μM , o explante cotilédone foi superior ao explante semente em relação ao %CAL (Figura 1B).

O percentual de risogênese (%RIZ) foi superior no explante semente, em relação ao explante cotilédone, em todas as concentrações de dicamba utilizadas (Figura 1C). Observa-se que na medida em que se aumenta a concentração de dicamba, %RIZ decresce para o explante semente, sendo as maiores médias encontradas nas duas concentrações mais baixas; e, em contraste, cresce para o explante cotilédone, com maiores médias nas duas concentrações mais elevadas (Figura 1C).

Foram encontradas interações entre os fatores (tipo de explante x concentração de picloram) para todas as características avaliadas (%PES, %CAL e %RIZ). O explante cotilédone foi superior ao explante semente em todas as concentrações de picloram para as características %PES e %CAL (Figuras 1D e 1E), com exceção do tratamento controle (0 μM de picloram), em que os tipos de explantes não diferiram entre si, já que não houve ocorrência de PES e a ocorrência de CAL foi quase nula para ambos os explantes.

Para %RIZ, o efeito da auxina picloram mostrou-se negativo para ambos os explantes utilizados, sendo as médias mais altas ocorrentes na ausência desse regulador de crescimento (Figura 1F). Nas concentrações de 0,0 e 20,71 μM , o explante semente proporcionou maiores médias de %RIZ em relação ao explante cotilédone.

Dentre as auxinas avaliadas, o picloram mostrou-se mais eficiente na indução de %PES e %CAL para espécie em estudo, apresentando valores de %PES de 80%;

enquanto que o maior valor encontrado para o dicamba não ultrapassou 50% (Figuras 1A e 1D). Em relação à %RIZ, o dicamba proporcionou maiores médias quando se consideram os dois tipos de explantes em conjunto no presente estudo.

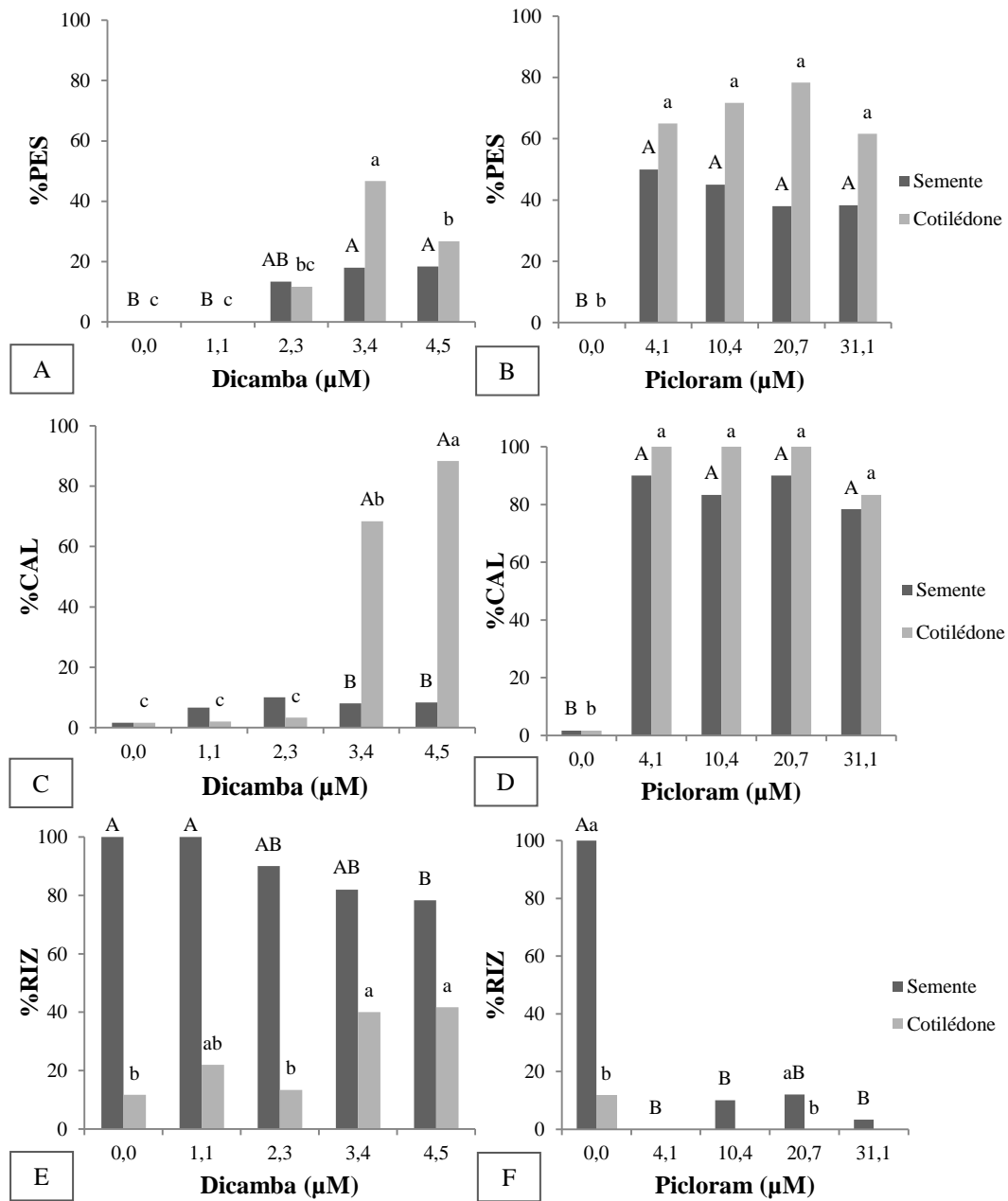


Figura 1: Porcentual de pró-embriões somáticos (%PES) em relação à concentrações de dicamba (A) ou picloram (D); porcentual de calogênese (%CAL) em relação à concentrações de dicamba (B) ou picloram (E); e porcentual de rizogênese (%RIZ) em relação à concentrações de dicamba (C) ou picloram (F) de explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Barras contempladas com a mesma letra maiúscula [para o explante semente (A, B, D e E) e os tipos de explantes dentro das concentrações de dicamba (C)] e minúscula [para o explante cotilédone (A, B, D e E) e os tipos de explantes dentro das concentrações de picloram (F)] não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Quando se utilizou sementes inteiras como explantes, observou-se que as mesmas germinaram e a indução de calos ou PES ocorreu em tecidos cotiledonares e radiculares da plântula germinada (Figuras 2A e 2B). É interessante observar que, quando se utilizou o picloram, os calos e PES foram induzidos na parte aérea do explante. Em contraste, com o uso do dicamba, observou-se formação de calos e PES na parte radicular do explante (Figuras 2A, 2B).

No geral, os pró-embriões somáticos primários tinham aspecto brilhante, amarelados e formados nas faces adaxial e abaxial dos cotilédones. Os calos embriogênicos são friáveis e oxidados (Figuras 2C e 2D).

Em alguns pró-embriões somáticos, observou-se início de diferenciação da protoderme, caracterizada por células organizadas adjacientemente, além do início da formação do procâmbio. No geral observa-se formação de um cordão fenólico delimitando as células formadoras dos pró-embriões somáticos (Figuras 2E, 2F e 2G), o que é característico na pré-formação de embriões somáticos em algumas espécies.

3.2. Proliferação de embriões somáticos

No geral, as médias de pró-embriões somáticos secundários (PESS) formados foram baixas e grande parte dos explantes oxidou e morreu após 40 dias de cultivo em meio semissólido. Os números médios encontrados para PESS no explante semente foram 0,00; 0,00; 1,00 e 0,80 para 4,14; 10,35; 20,71 e 31,06 μM de picloram respectivamente, e para o explante cotilédone foram 1,57; 0,88; 1,14 e 0,80 para 4,14; 10,35; 20,71 e 31,06 μM de picloram respectivamente.

Para o experimento de proliferação em meio líquido, foram realizadas somente análises descritivas. Observou-se que pró-embriões somáticos secundários (PESS) e primórdios radiculares (PR) se soltaram do calo embriogênico (CE) e se proliferaram em todos os tratamentos realizados (Figuras 3A e 3D). Os PESS tinham aspecto amarelado e brilhante e se destacavam ou se desenvolviam a partir do calo embriogênico inicial (Figuras 3B e 3D). Tais estruturas são de origem embriogênica ou meristemática, o que foi comprovado pela coloração avermelhada obtida após coloração com azul de evans e carmim acético (Figura 3C). Como no experimento anterior, alguns PESS iniciaram o processo de formação da protoderme e procâmbio (Figura 3E), porém alguns outros não formam essas estruturas ou quando há a formação da protoderme, por

algum motivo as células perdem essa capacidade e passam a proliferar novamente, impedindo a conclusão de sua formação.

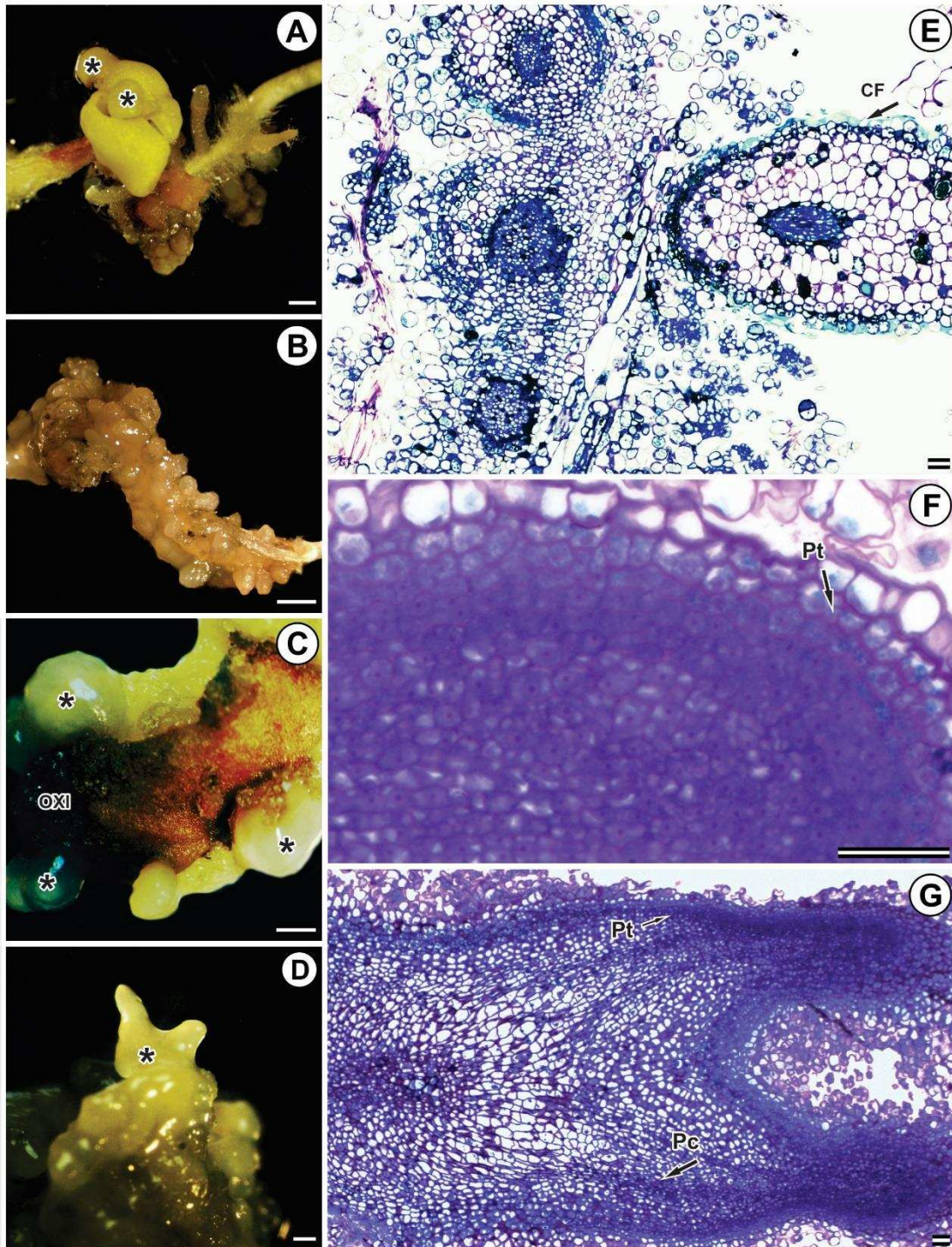


Figura 2: Pró-embriões somáticos (PES) em *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (A, B, C, D) capturados por estetoscopia; e secções longitudinais de PES (E, F, G) obtidas por fotomicroscopia de luz. PES induzidos a partir de sementes (A, B, D, E, e G) ou cotilédones (C e F), em meio de cultura contendo dicamba nas concentrações de $2,26\mu\text{M}$ (A e E), $3,39\mu\text{M}$ (B) e picloram na concentração de $10,35\mu\text{M}$ (C, D, F, G). As barras das figuras A, B, C e D equivalem a 1mm, a das demais figuras equivalem a 50 μm . Pt=Protoderme, Pc=Procâmbio e CF=Cordão Fenólico, OXI=oxidação, *=Pró-embrião somático.

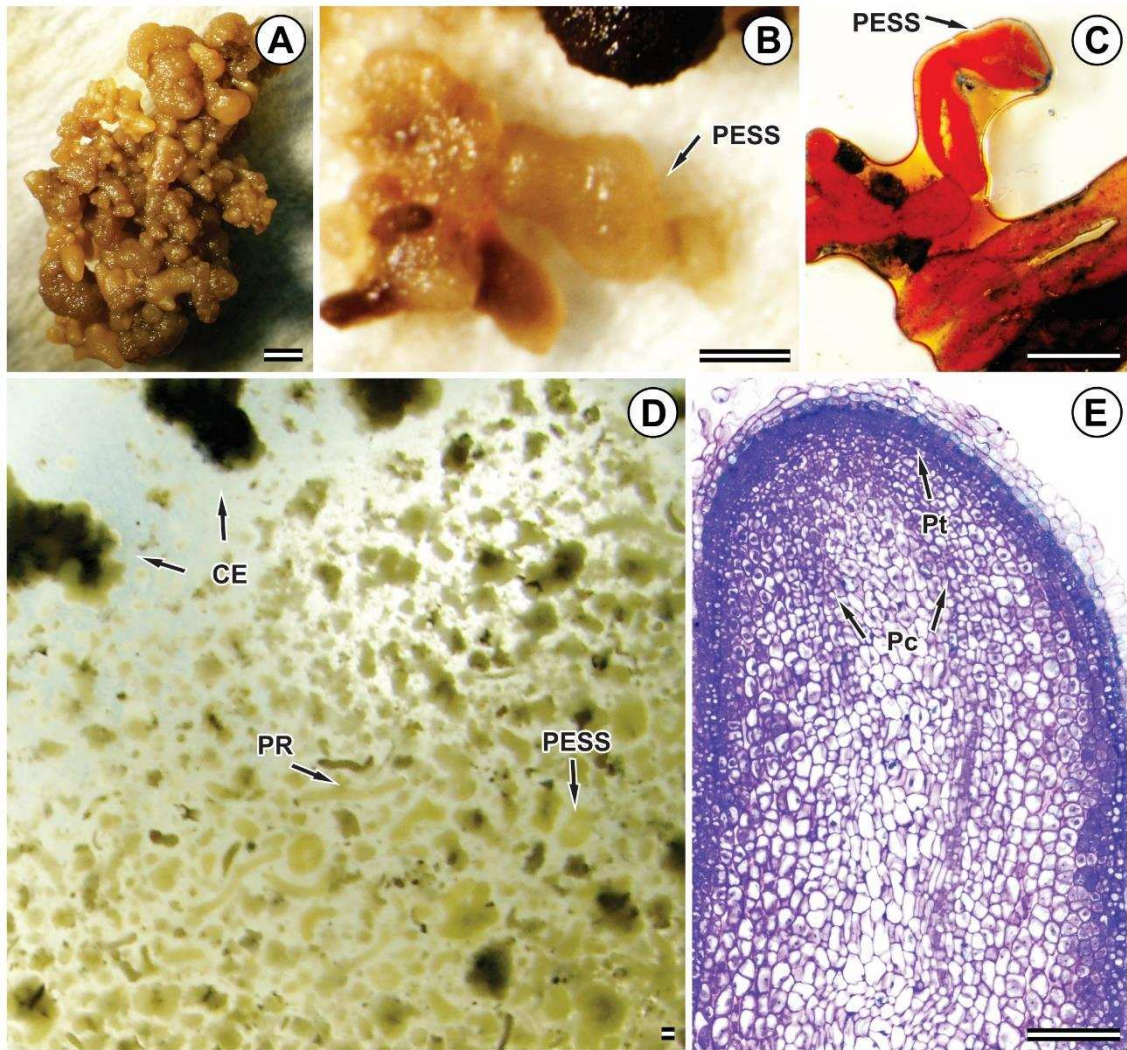


Figura 3: Pró-embriões somáticos secundários (PESS) em *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (A, B e D) capturados por estetoscopia; estrutura compactada in vivo (C) e secção longitudinal de PESS (E) obtidas por fotomicroscopia de luz. PESS induzidos a partir de calos embriogênicos (CE), em meio de cultura contendo picloram nas concentrações 4,14 μM (A) e 20,71 μM (B, c, D e E). A figura D corresponde ao meio de proliferação líquido contendo PESS, CE e primórdios radulares (PR). A barra da figura E equivale a 100 μm e as demais barras das demais figuras equivalem a 1 mm. Pt= Protoderme; Pc= Procâmbio.

4. Discussão

No presente estudo, tanto sementes inteiras como cotilédones foram fontes de explantes eficientes para a indução de embriogênese somática em *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. O potencial embriogênico tem sido maior em estruturas embrionárias (sementes, cotilédones, ápices radiculares), provavelmente por serem ricas em tecidos meristemáticos e, normalmente, esse potencial tende a diminuir na medida em que a estrutura se torna mais madura (folhas, pecíolos, caules) (FEHÉR, 2005). Semelhante ao

presente estudo, Titon et al. (2007) obtiveram embriões somáticos em sementes e cotilédones de *Eucalyptus grandis*, sendo o segundo tipo de explante o mais eficiente.

Outro fator determinante na indução de embriões somáticos em *Eucalyptus* e em diversas outras espécies é o nível de auxina presente na célula, que serve como agente causador do estresse inicial às células que passam a se desdiferenciar (FEHÉR, 2015). Em relação às auxinas, o picloram mostrou mais eficiente do que o dicamba na indução de embriogênese somática nas condições em que o presente trabalho foi conduzido. Titon et al. (2007) também obtiveram embriões somáticos em diversas fases de desenvolvimento utilizando 20,71 μ M de picloram em explantes de *Eucalyptus grandis*.

Em nível celular, as auxinas regulam a divisão, expansão e diferenciação celular. Dependendo do tecido específico, as auxinas podem promover alongamento axial, expansão lateral ou expansão isodiamétricas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Além disso, as auxinas sintéticas agem indiretamente por perturbar o metabolismo da auxina endógena, promovendo reorganização celular e induzindo a embriogênese somática (FEHÉR et al., 2003). Dessa forma, o tipo e a concentração de auxina exógena necessária para induzir a embriogênese somática são altamente variáveis entre as espécies. O picloram, por exemplo, tem sido eficaz na indução de embriogênese somática em espécies como cevada (SENER et al., 2008), tulipa (PTAK; BACH, 2007), pupunheira (STEINMACHER et al., 2007), macaúba (MOURA et al. 2009) e dendê (SCHERWINSKI-PEREIRA et al. 2010).

Para o experimento de proliferação, o meio líquido mostrou-se mais promissor em relação ao meio semissólido para induzir a embriogênese secundária. É provável que esse resultado seja por causa do aumento da disponibilidade de água, nutrientes, vitaminas e auxinas proporcionado por esse meio de cultivo (LEVIN et al., 1997; CHEN; ZIV, 2001), no qual não existe resistência física para a difusão desses componentes, quando comparado aos meios de cultura de consistência semissólida. Além disso, o maior contato dos explantes com o meio faz com que a taxa de assimilação dos compostos pelo material vegetal em cultivo seja favorecida no meio líquido (ZIV, 1995).

Apesar da formação incompleta dos embriões somáticos observada no presente estudo, eventos como a coloração avermelhada das estruturas durante o teste com azul de evans e carmim acético; início de formação da protoderme; presença de cordão fenólico circundando as estruturas embrionárias e a desconexão entre as estruturas

primárias e secundárias evidenciam a pré-formação de embriões somáticos primários e secundários. Esses eventos ocorrem durante a embriogênese somática em espécies como a macaúba, onde se observou a presença de compostos fenólicos, intensa divisão celular e os cordões de procâmbio sofrendo intensas multiplicações e diferenciação dos tecidos (MOURA et al., 2009).

Vale salientar que a proliferação de embriões secundários a partir de embriões primários pré-formados, pode ter ocasionado a má formação desses novos embriões, levando-os a oxidação e morte. Nessa situação, pode ter ocorrido o desvio de células ainda não diferenciadas e que ainda estavam expressando totipotência.

Apesar da indução inicial para embriões somáticos e a proliferação de embriões somáticos secundários, essas estruturas não se desenvolveram para germinação e formação de uma plântula (dados não publicados). Obviamente, a iniciação do desenvolvimento embriogênico em uma célula diferenciada requer uma reprogramação celular completa (FEHÉR, 2005). A recalcitrância ou competência à embriogênese somática depende também do fator genético, como já demonstrado para o eucalipto por Pinto et al., 2008.

Nos últimos anos, tornou-se aceito que o controle preciso de modificações da cromatina em resposta a estímulos ambientais e de desenvolvimento determina a expressão espacial e temporal correta dos genes (FEHÉR, 2015). Apesar de a auxina ser necessária, essa é insuficiente para criar a iniciação da embriogênese em células vegetais somáticas por conta própria (FEHÉR, 2005). Um modelo plausível da indução de embriogênese somática, portanto, pode basear-se em (pelo menos) dois fatores: auxina, que é responsável por um fator apropriado célula-ambiente, e outro desconhecido (s), incluindo o estresse e o fator genético, que desencadeiam o programa embriogênico (FEHÉR, 2005). Assim, estudos moleculares seriam interessantes para o gênero *Eucalyptus*, a fim de elucidar quais genes e fatores estão ligados em todo o processo embriogênico, além da experimentação de outros componentes do meio de cultura, como pH, concentrações de cálcio ou vitaminas, ou ainda outras concentrações, combinações e tipos de reguladores de crescimento.

5. Conclusões

- A indução de pró-embriões somáticos em material vegetal juvenil de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* pode ser obtida utilizando sementes ou cotilédones como

fonte de explantes, e dicamba e picloram como reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura;

- O uso de cotilédones como fonte de explantes promoveram maiores médias na indução de pró-embriões somáticos, quando comparadas com o uso de sementes.
- O uso de picloram adicionado ao meio de cultura promoveram maiores médias na indução de pró-embriões somáticos, quando comparadas com o uso de dicamba;
- A proliferação de pró-embriões somáticos secundários pode ser obtida utilizando meio líquido adicionado de picloram.

6. Referências Bibliográficas

CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-culture *Narcissus*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, p. 22-27, 2001.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress –induced remodeling of plant cell fate. **Biochim Biophys Acta. – Gene Regulatory Mechanisms**, v.1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? **Plant Cell Monographs**, n. 2, 2005.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 74, p. 201–228, 2003.

FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. **ExpDes: Experimental Designs package**. R package version 1.1.2. 2013. 42 p.

JAIN, S. M. An update on overall recent progress on somatic embryogenesis in forest trees. In: Suzuki K, Ishii K, Sakurai S, Sasaki S (eds) **Plantation technology in tropical forest science**. Springer, Tokyo, p. 113-122, 2006.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Jourkarnal of Cell Biology**, v. 137-138, 1965.

LEVIN, R.; ALPER, Y.; STAV, R.; WATAD, A. Methods and apparatus for liquidmedia and semi-automated micropropagation. **Acta Horticulturae**, v. 447, p. 659-663, 1997.

MERKLE, S. A. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. **Plant Tissue Culture Biotechnology**, v. 1, p. 112-121, 1995.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; SÁ JÚNIOR, A. Q.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 447–454, 2009.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962

MURALIDHARAN, E. M.; GUPTA, P. K.; MASCARENHAS, A. F. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 41-43, 1989.

MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. In vitro plantlet formation by organogenesis in *E. camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 256-259, 1987.

O'BRIEN, T. P; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcarphi Pty Ltd, Melbourne, 1981. 357 p.

PATK A.; BACH, A. Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. **In Vitro Celular and Developmental Biology - Plant**, v. 43, p. 35–39, 2007.

PINTO, G.; SANTOS, C.; NEVES, L.; ARAÚJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, v.21, n.3, p.208-213, 2002.

PINTO, G.; PARK, E. Y. S., NEVES, E. L.; ARAÚJO, E. C.; SANTOS, E. C. Genetic control of somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globules* Labill. **Plant Cell Reports**, n; 27, p.1093-1101, 2008.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.Rproject.org/>. 2014.

RAI, M. K., SHEKHAWAT, N. S. Recent advances in genetic engineering for improvement of fruit crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.116, p. 1–15, 2014.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.; GUEDES, R. S.; FERMINO, P. C.; DILVA, T. L.; COSTA, F. H. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Celular and Developmental Biology - Plant**, v. 46, p. 378–385, 2010.

SENER, O.; CAN, E.; ASRLAN, M.; CELIS, N. Effects of genotype and picloram concentrations on callus induction and plant regeneration from immature inflorescence of spring barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.). **Biotechnoly and Biotechnolical Equipament**, v. 22, p. 915–920, 2008.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Celular and Developmental Biology - Plant**, v.43, p. 124–132, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 5ª Ed., Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogenese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.31, n.3, p.417-426, 2007.

ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 393, p. 25-38, 1995.

US-CAMAS, R.; RIVERA-SOLÍS, G.; DUARTE-AKÉ, F.; DE-LA-PÊNA, C. In vitro culture: na epigenetic challenge for plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 118, v. 2, p. 187-201, 2014.

EFEITO DO CÁLCIO, BAP E PUTRESCINA NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*

Resumo - O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito de concentrações e fontes de cálcio, concentrações e tempo de efeito da citocinina BAP e da poliamina putrescina, na indução e desenvolvimento de embriões somáticos em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. No primeiro experimento, explantes cotiledonares foram inoculados em meio de cultura contendo cloreto de cálcio (meio MS) ou nitrato de cálcio (meio JADS) como fontes de cálcio. Variaram-se também as concentrações de cálcio, sendo: para o meio de cultura MS 4,40 g.L⁻¹ (controle – Ca), 6,60 g.L⁻¹ (aumento de 50% em relação ao controle - Ca50) e 8,80 g.L⁻¹ (aumento de 100% em relação ao controle - Ca100) de cloreto de cálcio; e para o meio JADS 11,81 g.L⁻¹ (Ca), 17,72 g.L⁻¹ (Ca50) e 23,62 g.L⁻¹ (Ca100) de cloreto de cálcio. No segundo experimento, os explantes cotiledonares foram inoculados no meio de indução primária (MIP) que continha apenas 20,71 µM de picloram como regulador de crescimento. Aos 10, 20 e 30 dias de indução primária, os explantes foram transferidos para um novo meio de indução secundária (MIS) contendo 20,71 µM de picloram e 11,10 µM de BAP ou 28,36 µM de putrescina. O meio de cultura contendo nitrato de cálcio proporcionou maior calogênese quando comparado ao meio contendo cloreto de cálcio. O aumento na concentração de cálcio dos meios utilizados no presente estudo não proporcionaram maiores percentuais de indução de pró-embriões somáticos. A adição 28,36 µM de putrescina ao meio de cultura proporcionou maior percentual de indução de embriogênese somática. O número de pró-embriões somáticos formados por explante foi superior quando se acrescentou BAP e putrescina ao meio de cultura se comparado com o meio contendo somente picloram.

Palavras-chave: micropropagação, propagação in vitro, embriogênese somática, JADS, poliamina.

1. Introdução

Diante do constante aprimoramento da clonagem de *Eucalyptus* e da busca de novas tecnologias para a produção de mudas da espécie, a embriogênese somática tem

despertado interesse de instituições de pesquisa e empresas florestais brasileiras que possuem avançados programas de melhoramento genético e de clonagem.

Na literatura científica são encontradas várias publicações referentes à propagação via embriogênese somática para algumas espécies do gênero *Eucalyptus*, como *Eucalyptus grandis* (MAJOR et al., 1997), *Eucalyptus nitens* (BANDYOPADHYAY et al., 1999; BANDYOPADHYAY; HAMILL, 2000), *Eucalyptus urophylla* (TIBOK et al., 1995; ARRUDA et al., 2000), *Corymbia citriodora* (MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1987; 1995) e *Eucalyptus globulus* (BANDYOPADHYAY et al., 1999). Entretanto, a aplicação da técnica em nível comercial torna-se limitada devido à inexistência de um protocolo completo, eficiente e reproduzível, desde a indução do embrião somático até a aclimação da plântula progagada.

São vários os fatores, bem como complexas as suas interações, que podem fazer com que células de tecidos vegetais tornem-se competentes a programas de neoformação e, assim, desenvolvam novos órgãos ou um novo organismo completo. Como principal fator, pode-se citar altas doses de auxinas, essenciais para a aquisição da competência embriogênica (FEHÉR, 2015).

Porém, diversos outros fatores interferem durante e nos processos subseqüentes à indução, como citocininas, poliaminas e íons de cálcio. Em plantas, as citocininas são necessárias para o estabelecimento da estrutura bipolar em embriões, além de melhorar o desenvolvimento embrionário após a indução do embrião somático (REE; GUERRA, 2015).

As poliaminas têm funções de regulação de processos fisiológicos durante a divisão celular (AHMAD et al., 2012), e têm sido estudadas como reguladores de crescimento em cultura de tecidos, bem como compostos de redução do estresse nas plantas (REIS et al., 2016). O efeito das poliaminas, principalmente da putrescina, sobre a embriogênese somática tem sido descrito para várias espécies (KEVERS et al., 2002; SAKHANOKHO et al., 2005; SILVEIRA et al., 2006; MALABADI; NATARAJA, 2007; NIEVES et al., 2008; WU et al., 2009; SILVEIRA et al., 2013; RAJESH et al., 2014).

Os íons de cálcio desempenham função de transdução de sinal a estímulos ambientais e também de mensageiros intracelulares em diversos processos do desenvolvimento da planta (POOVAIAH; REDDY, 1993; BUSH, 1995; WHITE; BROADLEY, 2003), dentre eles, o desenvolvimento embrionário. Alguns autores

sugerem que o aumento dos níveis de cálcio citoplasmático pode ser um importante fator de resposta embriogênica em diversas espécies (JANSEN et al., 1990; ETIENNE et al., 1997; ARRUDA et al., 2000; MALABADI; STANDEN, 2006; RAMAKRSIHNA et al., 2011).

Diante disso, o objetivo do presente estudo, foi verificar o efeito de concentrações e fontes de cálcio, concentrações e tempo de efeito da citocinina BAP e da poliamina putrescina, na indução e desenvolvimento de embriões somáticos em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal

Para a obtenção dos explantes utilizados no presente trabalho foram utilizadas sementes híbridas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* provenientes da APS 13 da empresa Gerdau, localizada em Três Marias-MG, coletadas em janeiro de 2011.

Para desinfestação, as sementes foram previamente lavadas em água corrente e, em câmara de fluxo laminar horizontal, imersas em álcool 70% durante 30 segundos e em seguida em hipoclorito de sódio 5% durante 15 minutos, sendo adicionado 4 gotas de detergente tween 20 a cada 100 mL de solução. Após o tratamento de desinfestação, as sementes foram lavadas seis vezes em água autoclavada e inoculadas em placas de petri estéreis descartáveis (90 x 15 mm) contendo 30 mL de meio de cultura semissólido previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos. O meio de cultura utilizado continha 50% dos sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 1,5% de sacarose, 50 mg.L⁻¹ de mio-inositol e 2,8 g.L⁻¹ de Phytigel® e pH ajustado para 5,8 ± 0,01. As sementes foram mantidas durante 7 a 10 dias em sala de crescimento a 24 ± 1 °C com fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 33 µmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro (LI-COR®, LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40W, Osram, Brasil).

2.2. Efeito do cálcio da indução de embriões somáticos

Foram utilizados os cotilédones das plantas germinadas in vitro como fonte de explantes, os quais foram inoculados em placas de petri estéreis descartáveis (60 x 15 mm) contendo 15 mL de meio de cultura MS ou JADS (CORREIA et al., 1995) com 100% dos sais (exceto cálcio) e vitaminas, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 3% de sacarose, 7 g.L⁻¹ de Agar Merk®, 20,71 µM mg.L⁻¹ de ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) e diferentes concentrações da solução de cálcio. A fonte de cálcio do meio de cultura MS foi o cloreto de cálcio, adicionada na concentração de 4,40 g.L⁻¹ (MURASHIGE; SKOOG, 1962). No meio de cultura JADS, a fonte de cálcio foi o nitrato de cálcio na concentração de 11,81 g.L⁻¹ (CORREIA et al., 1995). Os tratamentos aplicados consistiram no aumento da concentração do cálcio nos dois meios de cultura utilizados, sendo: para o meio de cultura MS, as concentrações de 4,40 g.L⁻¹ (Ca - controle), 6,60 g.L⁻¹ (Ca50 - aumento de 50% em relação ao controle) e 8,80 g.L⁻¹ (Ca100 - aumento de 100% em relação ao controle) de cloreto de cálcio; e para o meio JADS as concentrações de 11,81 g.L⁻¹ (Ca), 17,72 g.L⁻¹ (Ca50) e 23,62 g.L⁻¹ (Ca100) de cloreto de cálcio. O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,8± 0,01 e foi autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de cultura no escuro sob temperatura de 24±1 °C.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3 (dois tipos de meio de cultura e três concentrações da solução de cálcio), com 6 repetições e 10 explantes/parcela.

2.3. Efeito de BAP e putrescina na indução de embriões somáticos

Foram utilizados os cotilédones das plantas germinadas in vitro como fonte de explantes. Esses foram inoculados em placas de petri estéreis descartáveis (60 x 15 mm) contendo 15 mL de meio de cultura JADS com 100% dos sais e vitaminas, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 3% de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar. O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,8± 0,01 e foi autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos.

Os explantes foram mantidos em sala de cultura no escuro sob temperatura de 24±1 °C no meio de indução primária (MIP) que continha apenas 20,71 µM de picloram como regulador de crescimento. Aos 10, 20 e 30 dias de indução primária, os explantes

foram transferidos para um novo meio de indução secundária (MIS) contendo 20,71 µM picloram e 11,10 µM de 6-benzilamino purina (BAP) ou 28,36 µM 1,4-butanodiamina (putrescina).

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3 (dois tipos de meio de indução secundária - contendo BAP ou putrescina - e três intervalos de tempo entre o meio de indução primária para o meio de indução secundária), com 10 repetições e 10 explantes/parcela.

2.4. Coleta e análise de dados

Para ambos os experimentos de indução de embriões somáticos foram avaliados, aos 40 dias o percentual de pró-embriões somáticos (PES); o percentual de calogênese (CAL), que foi dividida em níveis alto (CA), médio (CM) ou baixo (CB); o percentual de explantes oxidados (OXI); o percentual de formação de calos friáveis (CF); e número médio de pró-embriões somáticos formados por explante (NES).

Para todas as análises dos dados obtidos, utilizou-se o programa estatístico R, versão 3.0.3 (R Core Team, 2014) e o pacote ExpDes (Experimental Designs) (FERREIRA et al., 2013), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade quando necessário.

Foi realizada também uma análise descritiva com documentação fotográfica in vivo realizada através de uma câmera digital (Olympus E-330) acoplada a um microscópio estetoscópio binocular.

2.5. Caracterização anatômica

Para a caracterização anatômica, foram coletados calos embriogênicos de todos os tratamentos realizados nos experimentos aos 40 dias de indução.

As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído (KARNOVSKY, 1965, modificado – 2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 3% sacarose, CaCl₂ 5 µM em tampão cacodilato 0,1 M pH 6,8), por no mínimo uma semana, desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historresin, Leica). Para a obtenção de cortes transversais e longitudinais com 5µm utilizou-se micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2255 – Leica) equipado com navalha de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina a pH 4,4 (O'BRIEN; McCULLY, 1981) por 10 minutos, e as

lâminas montadas com resina sintética (Permout). As imagens foram obtidas em fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

3. Resultados

3.1. Efeito do cálcio na indução de embriões somáticos

Foram encontradas diferenças entre os meios de cultura para as características percentual de calogênese total e seus níveis (CAL, CA, CM e CB) e para o percentual de formação de calos friáveis (CF). As médias no meio contendo nitrato de cálcio foram superiores para todas essas características (PES, CAL, CA, CM, OXI e NES), exceto para o percentual de calogênese em nível baixo (CB), em que o meio contendo cloreto de cálcio foi superior. As médias do meio de cultura contendo nitrato de cálcio foram CAL: 92%, CA: 24%, CM: 54%, CB: 13% e CF: 56% e para o meio de cultura contendo cloreto de cálcio foram: CAL: 74%, CA: 1%, CM: 37%, CB: 38% e CF: 24%.

Em relação à concentração de cálcio, diferenças foram encontradas para as médias das características percentual de oxidação (OXI), percentual de calogênese total (CAL), percentual de calogênese em nível baixo (CB) e percentual de formação de calos friáveis (CF), considerando as médias dos dois meios de cultura estudados (Figura 1).

Para o percentual de explantes oxidados, a média na concentração de Ca do controle foi significativamente superior à média daquela na concentração Ca50 (concentração 50% mais alta em relação ao controle) (Figura 1A).

Em relação ao percentual de calogênese, a média na concentração Ca (controle) foi superior à média na concentração Ca100 (concentração 100% mais alta em relação ao controle) para as características calogênese total (CAL) e calogênese em nível baixo (CB) (Figura 1B).

Para as características percentual de calos friáveis e percentual de formação de pró-embriões somáticos, a média na concentração Ca (controle) foi significativamente superior à média na concentração Ca100 (Figuras 1C e 1D).

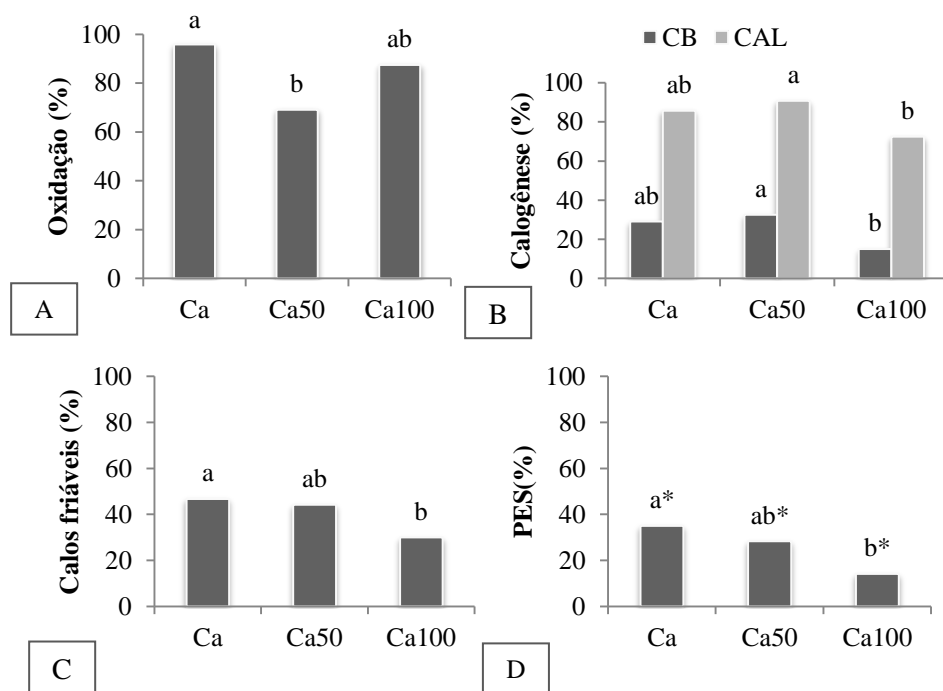


Figura 1: Porcentual de oxidação (A); porcentual de calogênese total (CAL) e porcentual de calogênese em nível baixo (CB) (B); porcentual de calos friáveis (C) e porção induzida de pró-embriões somáticos (PES) (D) em relação às diferentes concentrações de cálcio adicionadas ao meio de cultura [Ca – controle; Ca50 (aumento de 50% em relação ao controle) e Ca100 (aumento de 100% em relação ao controle)], em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* aos 40 dias. Médias contempladas com a mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. Letras contempladas com um asterisco foram comparadas pelo teste Tukey a 7% de probabilidade.

Pode-se observar que os pró-embriões somáticos são induzidos indiretamente, com a proliferação de células desorganizadas (calo) antecedendo a sua formação. No geral, os PES induzidos em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* se destacam por apresentarem cor amarelada e brilhante (Figuras 2A e 2B). Houve diferenciação da protoderme, caracterizada por células dispostas de forma contígua além do início da formação do procâmbio. Observa-se também, formação da estrutura bipolar, característica em embriões, com regiões de meristema apical caulinar (SAM) e de meristema apical radicular (RAM) (Figura 2G).

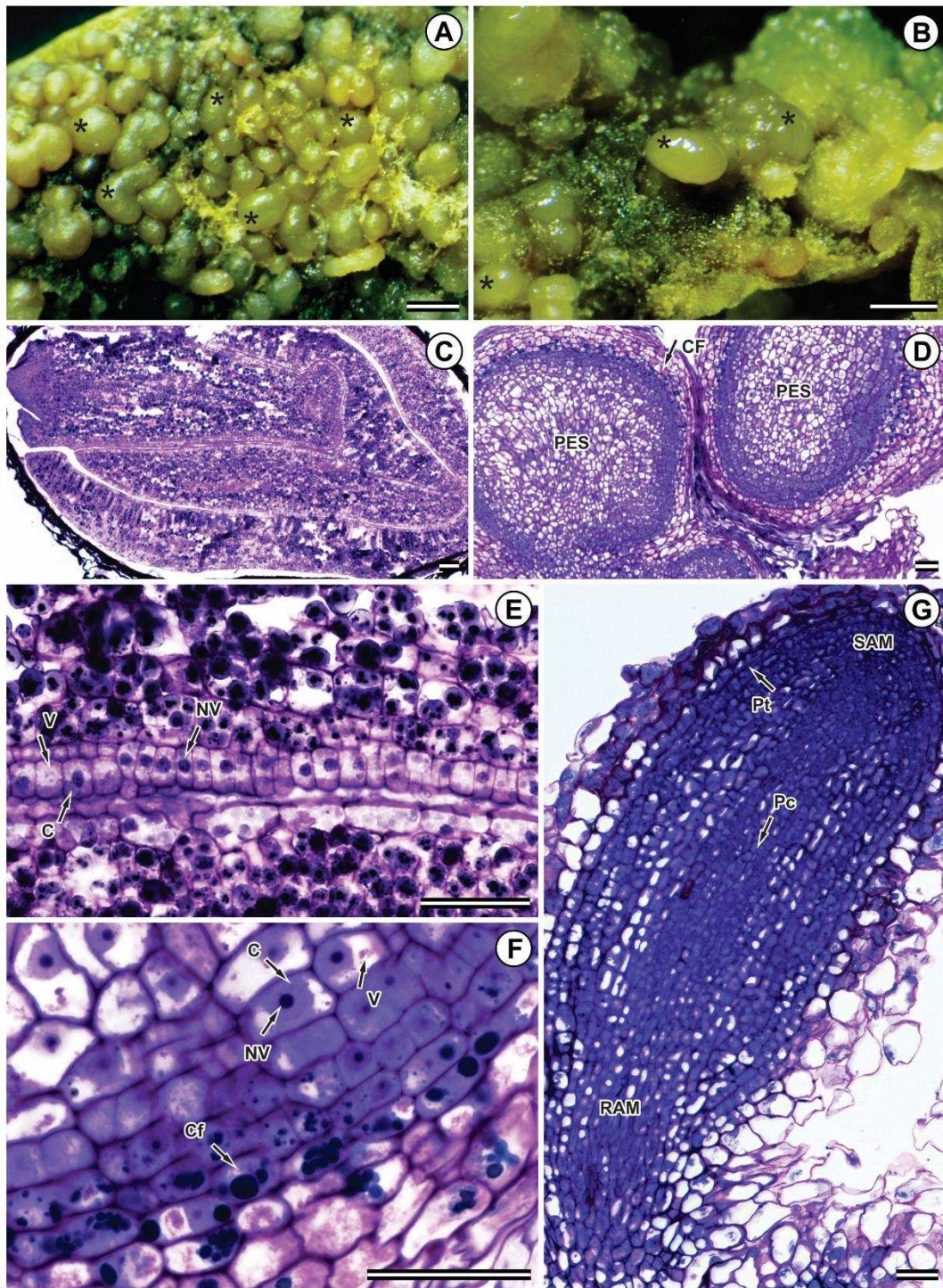


Figura 2: Calos embriogênicos contendo pró-embriões somáticos (PES) capturados por estetoscopia (A e B) e seções longitudinais obtidas por fotomicroscopia de luz (C, D, E, F e G) em *Eucalyptus grandis* x *E. urophyllas*. Embrião zigótico (semente) (C e E); Pró-embrião somático induzido em meio de cultura contendo nitrato de cálcio na concentração Ca50 (G); PES induzido em meio de indução secundária (MIS) contendo putrescina com 30 dias (B) entre o meio de indução primária (MIP) e o MIS; PES induzidos em MIS contendo BAP com 10 dias (D e F) e 30 dias (A) entre o MIP e o MIS. As barras das figuras A e B equivalem a 1 mm e as barras das demais figuras equivalem a 50 μ m. C= citoplasma; CF= cordão fenólico; Cf= compostos fenólicos; NV= núcleo volumoso; Pc= procâmbio; Pt= protoderme; V= vacúolo; RAM= meristema apical radicular; SAM= meristema apical caulinar; *= pró-embriões somáticos.

No geral, as médias do número de pró-embriões somáticos (NES) foram baixas: 1,0; 1,5 e 1,2 para Ca, Ca50 e Ca100 respectivamente, no meio contendo cloreto de cálcio; e 1,0; 0,8 e 1,4 para Ca, Ca50 e Ca100 respectivamente, no meio de cultura contendo nitrato de cálcio.

3.2. Efeito do BAP e putrescina na indução de embriões somáticos

Observou-se interação significativa entre os fatores testados para a característica percentual de oxidação dos explantes (OXI). No intervalo de 10 dias entre o meio de indução primária (MIP) e o meio de indução secundária (MIS), o MIS contendo a putrescina resultou em explantes oxidados significativamente superiores em relação aos MIS contendo o BAP. Nos demais intervalos de tempo entre MIP e MIS, os tipos de MIS não diferiram estatisticamente entre si em relação ao OXI (Figura 3A). No MIS contendo o BAP, o intervalo de 30 dias entre MIP e MIS foi superior ao intervalo de 10 dias, no que se refere ao percentual de explantes oxidados (Figura 3A).

Houve diferença significativa entre os intervalos de tempo entre o meio de indução primária (MIP) e o meio de indução secundária (MIS) para característica percentual de calogênese em nível alto (CA) (Figura 3B). O intervalo de 30 dias entre MIP e MIS foi superior ao intervalo de 20 dias em relação a CA (Figura 3B). Vale ressaltar que a ocorrência de calos friáveis foi alta nesse experimento como pode ser observado na Figura 3B.

Para a característica percentual de formação de pró-embriões somáticos (PES), o MIS contendo a putrescina (média 47%) mostrou-se mais eficiente na indução de ES do que o MIS contendo BAP (média 23%) (Figura 3C). Observando a Figura 2, os PES foram formados de forma indireta e com cor amarelada e brilhante (Figuras 2A e 2B). Observa-se também o início de diferenciação da protoderme, caracterizada por células organizadas adjacientemente (Figuras 2F). No geral, as células formadoras de embriões possuem alta relação núcleo/citoplasma, possuem vacúolos menores, como pode ser observado nas semelhanças entre as figuras 2E e 2F, onde a primeira corresponde a um embrião zigótico e a segunda um pró-embrião somático. Observa-se ainda, formação de um cordão fenólico delimitando o PES, bem como presença de compostos fenólicos dentro da célula (Figuras 2C, 2D e 2F), o que é característico na pré-formação de embriões somáticos e zigóticos em algumas espécies.

É interessante ressaltar que, as médias de NES encontradas nesse segundo experimento foram até quatro vezes maiores do que as encontradas no experimento anterior, como podem ser observadas na Figura 3D e comparando as figuras 2A e 2B.

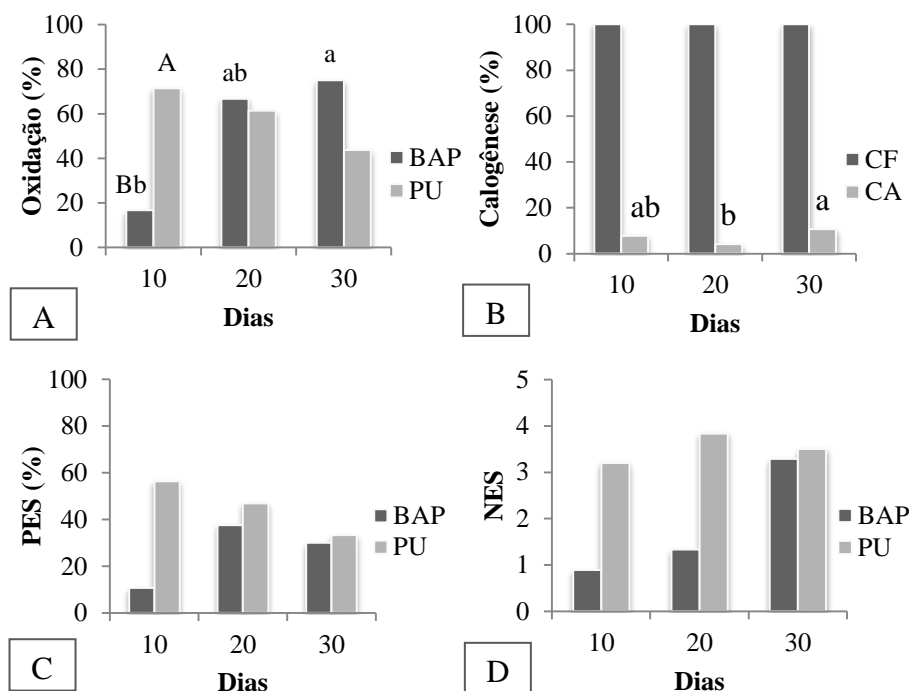


Figura 3: Porcentual de oxidação (A); porcentual de calogênese em nível alto (CA) e de calos friáveis (CF) (B); porcentual de indução de pró-embriões somáticos (PES) (C); e número médio de pró-embriões somáticos ocorrentes por explante (NES) em relação aos diferentes meios de indução secundária (MIS), com BAP ou putrescina (PU) e em relação aos diferentes intervalos de tempo entre o meio de indução primária (MIP) e o MIS, em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* aos 40 dias. Médias contempladas com a mesma letra maiúscula, não diferem entre si, em relação aos tipos de MIS no intervalo de 10 dias; e médias contempladas com a mesma letra minúscula, não diferem entre si, em relação aos intervalos de tempo entre MIP e MIS; pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

4. Discussão

A embriogênese somática indireta, característica de espécies do gênero *Eucalyptus*, tendo sido aquela onde há formação de uma massa desorganizada de células (calo) precedendo a formação do embrião. Sendo assim, as características de calogênese avaliadas no presente estudo, servem como indícios positivos de formação de embriões somáticos futuros, em especial quando há formação de calos friáveis. O calo friável é mais adequado para iniciar culturas em suspensão, se comparado ao calo compacto, pois as células se apresentam desconectadas umas das outras, com ausência de elementos vasculares e intercaladas com espaços intercelulares (FRANSZ; SCHEL, 1991).

No presente estudo, foram observados altos percentuais de oxidação dos explantes. A oxidação pode ocorrer quando, em contato com o meio de cultura, o explante excisado produz metabólitos secundários resultando numa cor amarronzada do tecido (Figuras 2A e 2B). Em algumas espécies não lenhosas, a oxidação dos calos provoca ausência do processo embriogênico e até a morte do explante (TAKAMORI et al., 2015). Em espécies lenhosas, como o *Eucalyptus*, tem-se observado que a oxidação dos calos embriogênicos é um processo que antecede a formação do embrião.

Em nível histológico e celular pode-se observar a presença desse cordão fenólico e de compostos fenólicos dentro das células de calos embriogênicos do presente estudo (Figuras 2D e 2F). A oxidação de tecidos normalmente é observada em situações de estresse, que, em níveis mais baixos, provocam alterações na fisiologia e no metabolismo das células e induzem mecanismos de adaptação (FEHÉR, 2003) como cicatrizações, organogênese e embriogênese somática.

No presente estudo, observou-se a interferência das concentrações de cálcio na calogênese dos explantes. Um aumento na concentração de cálcio, até certo limite, inibe o transporte intercelular nas plantas através do fechamento de plasmodesmas (TUCKER 1990). Este isolamento das células iniciais é importante para dar início a formação de calos friáveis e o processo embriogênico (WILLIAMS; MAHESWARAN 1986).

A calogênese em todos os seus níveis e a produção de calos friáveis foi superior quando se usou o meio de cultura JADS, em que a fonte de cálcio foi o nitrato de cálcio, em relação meio MS, em que a fonte de cálcio foi o cloreto de cálcio. Uma das principais diferenças entre os dois meios de cultura é a quantidade e a fonte do cálcio, sendo que o meio JADS possui mais do que o dobro de cálcio em sua formulação. Experimentos com bloqueadores e quelantes de cálcio inseridos no meio de indução de embriogênese somática de sândalo e cenoura indicaram que o influxo de cálcio exógeno é essencial para o início da embriogênese somática (OVERVOODE; GRIMES, 1994; ANIL; RAO, 2000; ANIL et al., 2000). Concentrações maiores de cálcio no meio de cultura favoreceu a manutenção do potencial embriogênico e produção de embriões somáticos em culturas de células de cenoura (*Daucus carota*) (JANSEN et al., 1990), seringueira (*Hevea brasiliensis*) (ETIENNE et al., 1997), eucalipto (*Eucalyptus urophylla*) (ARRUDA et al., 2000) e café (*Coffea canephora*) (RAMAKRISHNA et al., 2011).

Em *Pinus*, os íons de cálcio funcionam como um segundo mensageiro na transdução de sinal da embriogênese somática (MALABADI; STANDEN, 2006). O

cálcio também participa do início da polaridade celular durante a embriogênese somática (OVERVOORDE; GRIMES, 1994; TIMMERS et al., 1989, 1996). Em estudos com cenoura, observaram-se variações temporais e espaciais do cálcio endógeno. As concentrações de cálcio variavam de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário, de acordo com o nível de auxinas e citocininas, e se concentravam nas regiões do nucléolo e na protoderme do embrião somático (TIMMERS et al., 1996). Esses estudos mostram o quão sensível e variável é a concentração de cálcio dentro de células embriogênicas, sendo interessante estudos mais detalhados sobre esse macronutriente na embriogênese somática do *Eucalyptus*.

A ação da putrescina na indução de pró-embriões somáticos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em explante juvenil foi positiva no presente estudo. O percentual de embriogênese somática (ES) do meio de indução secundária (MIS) contendo putrescina foi o dobro daquele de ES no MIS contendo BAP.

Apesar da citocinina endógena exercer funções essenciais no processo embriogênico, observou-se no presente estudo que sua aplicação exógena promoveu ganhos somente referentes à quantidade de pró-embriões somáticos por explante. Uma alternativa à adição de citocininas no meio de indução de ES é a inclusão de poliaminas como a putrescina, que também podem ser classificadas como agentes reguladores de crescimento em plantas.

As poliaminas são moléculas pequenas, de baixo peso molecular, alifáticas que têm grupos amino-policatiônicos capazes de interagir eletrostaticamente com moléculas de ácidos nucléicos, fosfolipídios, compostos da parede celular e proteínas (BARON; STASOLLA, 2008; TIBURCIO et al., 2014). As principais poliaminas ocorrentes em plantas são a putrescina, cadaverina, espermidina e espermina, geralmente associadas com a regulação de processos fisiológicos durante a divisão celular, síntese protéica, replicação do DNA e respostas a estresse abiótico, atuando em processos de organogênese, embriogênese, desenvolvimento de flores, senescência e maturação de frutos (AHMAD et al., 2012).

O comportamento das poliaminas parece seguir um padrão semelhante em algumas espécies como *Vitis vinifera* (BERTOLDI et al., 2004), *Coffea canephora* (DELA-PENA et al., 2008), *Pinus sylvestris* (VUOSKU et al., 2012) e cana de açúcar (SILVEIRA et al., 2013) durante a indução da embriogênese somática, com a presença de uma grande concentração de putrescina, seguido de um intermediário conteúdo da espermidina e um menor teor de espermina. Reis et al. (2016) sugerem que a função da

putrescina pode estar relacionada com a modulação da expressão de peroxidases e outras proteínas responsáveis pelo suporte às células ao estresse oxidativo induzido por uma excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Em *Pinus*, o acréscimo de um inibidor da biossíntese de putrescina no meio de cultura inibiu a indução de ES (MALABADI; NATARAJA, 2007). Em cana de açúcar, a incorporação da putrescina exógena resultou em elevado conteúdo intracelular de putrescina livre, responsável por induzir melhor desempenho na maturação dos embriões somáticos (REIS et al., 2016). Em algodão, a inclusão da putrescina promoveu a germinação e a regeneração de plântulas produzidas via ES (SAKHANOKHO et al., 2005).

Durante a indução da embriogênese somática em plantas, a forma mais comum de se induzir o estresse inicial é com a aplicação de altas concentrações de auxinas. Há a interação da auxina exógena com hormônios endógenos, modificação da expressão gênica e indução da desdiferenciação e rediferenciação celular em estado embriogênico (JIMÉNEZ, 2005). Após o impulso inicial para o processo embriogênico, a aplicação exógena de outros reguladores de crescimento pode ser essencial, como citocininas, responsável pela formação de eixos e estabelecimento do meristema bipolar em embriões (REE; GUERRA, 2015), ou poliaminas muitas vezes associadas com a divisão celular e tolerância ao estresse (KAUR-SAWHNEY et al., 2003). Por esse motivo, objetivou-se no presente estudo elucidar em qual fase da indução da embriogênese somática devem-se acrescentar outros tipos de reguladores de crescimento. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas para o intervalo de acréscimo da putrescina ou o BAP no meio de indução de embriogênese somática.

No que se refere ao número de ES produzidos por explante, tanto a aplicação de BAP como a de putrescina promoveram maior produção de pró-embriões, se comparados ao experimento em que se adicionou somente picloram. Com a adição de putrescina ao meio de cultura, a produção de embriões somáticos de cana de açúcar foi quase triplicada em relação ao controle (REIS et al., 2016). Esse acréscimo na produção de embriões somáticos pode ser atribuído ao aumento da divisão celular, função regulada tanto por citocininas como por poliaminas.

5. Conclusões

- O meio de cultura contendo nitrato de cálcio proporcionou maior calogênese em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, quando comparado ao meio contendo cloreto de cálcio;
- O aumento na concentração de cálcio dos meios utilizados no presente estudo não proporcionaram maiores percentuais de indução de pró-embriões somáticos;
- A adição de 28,36 μM de putrescina ao meio de cultura proporcionou maior percentual de indução de embriogênese somática em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*;
- O número de pró-embriões somáticos formados por explante foi superior quando se acrescentou BAP e principalmente putrescina ao meio de cultura se comparado com o meio contendo somente picloram.

6. Referências Bibliográficas

AHMAD, P.; KUMAR, A.; GUPTA, A.; HU, X.; HAKEEM, K. R.; AZOOZ, M., SHARMA, S. Polyamines: role in plants under abiotic stress, in ASHRAF, M.; OZTURK, A.; MSA, A. Aksoy (Eds.), **Crop Production for Agricultural Improvement**, Springer 2012, pp. 491–512.

ANIL, V.S., HARMON, A.C., RAO, K.S. Spatio-temporal accumulation and activity of calcium-dependent protein kinases during embryogenesis, seed development and germination in sandalwood. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1035–1041, 2000.

ANIL, V.S., RAO, K.S. Calcium-mediated signaling during sandalwood somatic embryogenesis: role for exogenous calcium as second messenger. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1301–1311, 2000.

ARRUDA, S.C.C., SOUZA, G.M., ALMEIDA, M., GONEALVES, A.N. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 145–154, 2000.

BANDYOPADHYAY, S. et al. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, v.140, p.189-198, 1999.

BANDYOPADHYAY, S.; HAMILL, J. D. Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. **Annals of Botany**, v.86, p.237-244, 2000.

BARON, K.; STASOLLA, C. The role of polyamines during in vivo and in vitro development, **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 44, p. 384–395, 2008.

BERTOLDI, D.; TASSONI, A.; MARTINELLI, L.; BAGNI, N. Polyamines and somatic embryogenesis in two *Vitis vinifera* cultivars, **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 657–666, 2004.

BUSH, D. S. Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, n. 46, n. 95–122; 1995.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. Y. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF**, n. 48/49, p. 107-116, 1995.

DE-LA-PENA, C.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. Possible role of light and polyamines in the onset of somatic embryogenesis of *Coffea canephora*, **Molecular Biotechnology**, v. 39, p. 215–224, 2008.

ETIENNE, H., LARTAUD, M., CARRON, M.P., MICHAUX-FERRIERE, N. Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.). **Journal of Experimental Botany**, v.48, p. 129–137, 1997.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress –induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatics plant cells to embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 74, p. 201–228, 2003.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: Experimental Designs pacakge**. R package version 1.1.2., 2013. 42 p.

FRANSZ, P. F.; SCHEL, J. H. N. Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*) **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 1, p. 26-33, 1991.

JANSEN, M.A.K., BOOIJ, H., SCHEL, J.H.N., DE VRIES, S.C. Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 221–223, 1990.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91–110, 2005.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KAUR-SAWHNEY, R.; TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T.; GALSTON, A. W. Polyamines in plants: an overview. **Jornal of Cell and Molecular Biology**, v. 2, p. 1–12, 2003.

KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J. The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng* in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 70, p. 181–188, 2002.

MAJOR, G.; KRAUSE, M.; ROSS, S.; SOTELO, M. Preliminary studies on the somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *Eucalyptus*, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: Embrapa, 1997. v. 1. p.137-142.

MALABADI, R. B.; NATARAJA, K. Putrescine influences somatic embryogenesis and plant regeneration in *Pinus gerardiana* Wall. **American Journal of Plant Physiology**, v. 2, n. 2, p. 107-114, 2007.

MALABADI, R. B.; VAN STADEN, J. Cold-enhanced somatic embryogenesis in *Pinus patula* is mediated by calcium. **South African Journal of Botany**, v. 72, p. 613–618, 2006.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962

MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. In vitro plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *E. citriodora*. **Plant Cell Reports**, v.6, p.256-259, 1987.

MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed.). **Somatic embryogenesis in Woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.v.2. p.23-40.

NIEVES, N.; SAGARRA, F.; GONZALEZ, R.; LEZCANO, Y.; CID, M.; BLANCO, M. A. et al. Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum* sp.) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 313–320, 2008.

O'BRIEN, T. P.; MCCYLLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Termarcarphi OPTY. LTD: Melbourne, 1981. 357 p.

OVERVOORDE, P.J., GRIMES, H.D. The role of calcium and calmodulin in carrot somatic embryogenesis. **Plant and Cell Physiology**, v. 35, p. 135–144., 1994.

POOVAIAH, B. W.; REDDY, A. S. N. Calcium and signal transduction in plants. **Critical Reviews i Plant Scienses**, n. 12, p. 185–211; 1993.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.Rproject.org/>. 2014.

RAJESH, M. K.; RADHA, E.; SAJINI, K. K.; KARUN, A. Polyamine-induced somatic embryogenesis and plantlet regeneration in vitro from plumular explants of dwarf cultivars of coconut (*Cocos nucifera*) **Indian Journal of Agricultural Sciences/Short communication**, v. 84, n. 4, p. 527–30, 2014.

RAMAKRISHNA, A.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G. A. Calcium and calcium ionophore A23187 induce high-frequency somatic embryogenesis in cultured tissues of *Coffea canephora* P ex Fr. **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, v. 47, n. 6, p. 667-673, 2011.

REE, J. F.; GUERRA, M. P. Palm (*Arecaceae*) somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, v. 51, p. 589–602, 2015.

REIS, R. S.; VALE, E. M.; HERINGER, A. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. **Journal of Proteomics**, v. 130, p. 170–179, 2016.

SAKHANOKHO, H. F.; OZIAS-AKINS, P.; MAY, O. L.; CHEE, P. W. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 91–95, 2005.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; TUN, N. N.; SCHERER, G. F. E.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P. Effects on the endogenous polyamine contents, nitric

oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, **Plant Science**, v. 171, p. 91–98, 2006.

SILVEIRA, V.; VITA, A. M.; MACEDO, A. F.; DIAS, M. R. F.; FLOH, E. I. S.; SANTA CATARINA, C. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 114, p. 351–364., 2013.

TAKAMORI, L. M.; NETO, N. B. M.; VIEIRA, L. G. E.; RIBAS, A. F. Optimization of somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration of *Urochloa* species using picloram. **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, v. 51, p. 554–563, 2015.

TIBOK, A. et al. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, v.110, p.139-145, 1995.

TIBURCIO, A.; ALTABELLA, T.; BITRIÁN, M.; ALCÁZAR, R. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress, **Planta**, v. 240, p. 1–18, 2014.

TIMMERS, A.C.J., DE VRIES, S.C., SCHEL, J.H.N.. Distribution of membrane-bound calcium and activated calmodulin during somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). **Protoplasma**, v. 153, p. 24–29, 1989.

TUCKER, E. B. Calcium-loaded 12-bis (2-aminophenoxy) ethane- N N N ' N ' - tetraacetil.c acid. block.s cell-.to-cel l dtffusion of carboxy fluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. **Planta** 182:34-38, 1990.

VUOSKU, J.; SUORSA, M.; RUOTTINEN, M.; SUTELA, S.; MUILU-MAKELA, R.; JULKUNEN-TIITTO, R. et al. Polyamine metabolism during exponential growth transition in Scots pine embryogenic cell culture, **Tree Physiology**, v. 32, p. 1274–1287, 2012.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, n. 92, v. 4, p. 487-511, 2003.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

WU, X. B.; WANG, J.; LIU, J. H.; DENG, X. X. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol, **Jornal of Plant Physiology.**, v. 166, p. 52–62, 2009.

EFEITO DO PULSO DE AUXINA NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*

Resumo - O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito de diferentes intervalos de pulsos de auxina na indução de embriões somáticos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, bem como a observação do comportamento embriogênico de calos sob efeito do estresse auxínico. Cotilédones foram inoculados em meio de cultura contendo 207,07 μM de picloram, tratamento considerado como pulso de auxina. Com base nesse material instalado, foram realizados dois experimentos. No experimento 1, explantes que estavam no tratamento de pulso de auxina foram transferidos para meio semissólido ou líquido, contendo 20,71 μM de picloram, após 1, 2, 4 ou 8 dias de pulso de auxina. No experimento 2, explantes que estavam no tratamento de pulso de auxina foram transferidos para meio semissólido contendo 20,71 μM de picloram, após 1, 2 ou 3 dias de pulso de auxina. Tratamentos com pulso da auxina picloram (207,02 μM) podem ser utilizados como fonte de estresse inicial para aquisição da competência embriogênica em explantes cotiledonares e *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. A indução média de calos embriogênicos foi superior no intervalo de dois dias de pulso de auxina, em relação aos outros dois intervalos testados tanto aos 30 dias, como aos 37 e 44 dias de avaliação. A oxidação de explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* pode ser considerada um indício de formação de calos embriogênicos. A presença de pectinas em regiões periféricas de pró-embriões somáticos pode ser vista como marcador de embriogênese somática em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

Palavras-chave: embriogênese somática, estresse auxínico, micropropagação, propagação in vitro.

1. Introdução

A embriogênese somática foi desenvolvida com o intuito de alcançar altas e rápidas taxas de multiplicação in vitro de espécies vegetais, e os avanços das pesquisas nesse sentido visam proporcionar sua utilização não somente como uma técnica de pesquisa, mas com aplicação na escala comercial (PINTO, et. al. 2009).

Na área florestal, a adoção da embriogênese somática visa, entre outras aplicações, sua utilização na produção em larga escala de mudas clonais, como técnica de propagação vegetativa dentro de programas do melhoramento florestal, ou ainda como técnica de rejuvenescimento de clones com propósitos na silvicultura clonal.

Entretanto, baixas taxas de iniciação embriogênica observadas em espécies de *Eucalyptus* (PINTO et al, 2002; MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1995; WATT et al., 1999), incapacidade dos embriões somáticos em atingir a plena maturidade e germinar (MURALIDHARAN et al., 1989; MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1995) e ocorrência de variação somaclonal, (MERKLE, 1995; JAIN, 2006) têm limitado a sua adoção como técnica comercial.

Dentre os vários fatores que interferem na propagação via embriogênese somática, sabe-se que altas doses de auxina são essenciais como gatilho inicial na aquisição da competência celular, provocando a desdiferenciação e rediferenciação embriogênica (FEHÉR, 2015). Porém, a exposição contínua do explante aos reguladores de crescimento, sobretudo auxinas, pode provocar efeitos negativos sobre a morfologia das plantas propagadas *in vitro*, como hiperidricidade, nanismo, fasciação, distorção de estruturas (AHMAD; ANIS, 2012) ou variação somaclonal.

Uma estratégia para utilização da dosagem de auxina necessária para indução de embriões somáticos, mesmo em espécies recalcitrantes, como é o caso do *Eucalyptus*, sem provocar grandes danos à plântula propagada, seria o uso de tratamentos com pulso de auxina.

Tratamentos de pulso com a auxina 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) foram utilizados para indução de embriões somáticos em espécies vegetais como cenoura (*Daucus carota*) (KITAMIYA et al., 2000), goiabeira serrana (*Feijoa Selowina*) (GUERRA et al., 2001), batata (*Solanum tuberosum*L.) (SHARMA et al., 2007) e mamão (*Caric apapaya* L.) (KOEHLER et al., 2013), e com a auxina ANA (ácido naftalenoacético) em feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.) (AASIM, 2010).

Pulsos de diferentes auxinas promoveram também, morfogênese de raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* (PICOLI et al., 2006). Contudo, na literatura, não há relatos sobre tratamentos de pulso de auxina na indução de embriões somáticos de espécies de *Eucalyptus*.

Diante disso, o objetivo do presente estudo, foi verificar o efeito de diferentes intervalos de pulsos de auxina na indução de embriões somáticos de *Eucalyptus grandis*

x *E. urophylla*, bem como a observação do comportamento embriogênico de calos sob efeito do estresse auxínico.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Para a obtenção dos explantes utilizados no presente trabalho foram utilizadas sementes híbridas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* provenientes da APS 13 da empresa Gerdau, localizada em Três Marias-MG, coletadas em janeiro de 2011. Para desinfestação, as sementes foram previamente lavadas em água corrente e, em câmara de fluxo laminar horizontal, imersas em álcool 70% durante 30 segundos e em seguida em hipoclorito de sódio 5% durante 15 minutos, sendo adicionado 4 gotas de detergente tween 20 a cada 100 mL de solução. Após o tratamento de desinfestação, as sementes foram lavadas seis vezes em água autoclavada. Para obtenção dos cotilédones, as sementes já desinfestadas foram colocadas para germinação em placas de Petri estéreis descartáveis (90 x 15 mm) contendo 30 mL de meio de cultura semissólido previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos. O meio de cultura utilizado continha 50% dos sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 1,5% de sacarose, 50 mg.L⁻¹ de mio-inositol e 2,8 g.L⁻¹ de Phytigel[®] e pH ajustado para 5,8 ± 0,01. As sementes foram mantidas durante 7 a 10 dias em sala de cultivo a 24 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 33 μmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro (LI-COR[®], LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40W, Osram, Brasil).

2.2. Indução de embriões somáticos

Cotilédones foram utilizados como explantes e inoculados em erlenmeyers de 250 mL contendo 20 mL de meio líquido MS com 100% dos sais e vitaminas, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 3% de sacarose e pH ajustado para 5,8 ± 0,01, previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos. Foi adicionado ao meio de cultura 207,07 μM de ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram), tratamento considerado como pulso de auxina.

Os erlenmeyers, contendo 20 explantes (cotilédones) cada, foram mantidos em sala de cultura no escuro sob temperatura de 24 ± 1 °C, com agitação de 50 rpm para manter a oxigenação no meio de cultura para o tratamento de pulso de auxina. Com base nesse material instalado, foram realizados dois experimentos, conforme descrito a seguir.

2.2.1. Experimento 1:

Explantes que estavam no tratamento de pulso de auxina foram transferidos para placas de Petri estéreis descartáveis (60 x 15 mm) contendo 10 mL de meio MS semissólido ou para erlenmeyers de 125 mL contendo 10 mL de meio MS líquido. O meio de cultura utilizado nessa etapa (meio de indução de embriões somáticos), foi preparado com 100% dos sais e vitaminas, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, 3% de sacarose, $2,8 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel® (para o meio semi-sólido) e $20,71 \text{ }\mu\text{M}$ de picloram, pH ajustado para $5,8 \pm 0,01$, previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos.

A transferência dos explantes do meio de pulso de auxina para o meio de indução de embriões somáticos foi realizada após 1, 2, 4 ou 8 dias de pulso de auxina. Foi realizado também o tratamento controle, onde os explantes foram inoculados diretamente no meio de indução de embriões somáticos, sem o pré-tratamento com pulso de auxina.

Todos os explantes foram mantidos em sala de cultura no escuro sob temperatura de $24\pm 1^\circ\text{C}$ e agitação de 50 rpm (meio líquido) para manter a oxigenação no meio de cultura.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×5 , constituído por dois tipos de meio de cultura (semissólido ou líquido) e cinco tempos de pré-tratamento com pulso de auxina (0, 1, 2, 4 e 8 dias), com 6 repetições e 10 explantes/parcela.

Após 30 dias de indução, foram avaliados os percentuais de calogênese, de calos friáveis e de calos que continham pró-embriões somáticos (calos embriogênicos). Foi avaliada também, aos 30 dias, a presença ou ausência de oxidação dos explantes/calos. Foram realizadas coletadas amostras para análise de microscopia de luz e para documentação fotográfica in vivo realizada através de uma câmera digital (Olympus E-330) acoplada a um microscópio estetoscópio binocular.

2.2.2. Experimento 2:

Explantes que estavam no tratamento de pulso de auxina foram transferidos para placas de Petri estéreis descartáveis (60 x 15 mm) contendo 15 mL de meio MS semissólido, preparado com 100% dos sais e vitaminas, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 3% de sacarose, 2,8 g.L⁻¹ de Phytigel® e 20,71 µM de picloram, pH ajustado para 5,8 ± 0,01, previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos.

A transferência dos explantes do meio de pulso de auxina para o meio de indução de embriões somáticos foi realizada após 1, 2 ou 3 dias de pulso de auxina. Todos os explantes foram mantidos em sala de cultura no escuro sob temperatura de 24±1 °C.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (1, 2 ou 3 dias de pulso de auxina) com 10 repetições e 10 explantes/parcela.

Aos 30, 37 e 44 dias de indução foram avaliados os percentuais de oxidação, calogênese, de calos friáveis e explantes contendo pró-embriões somáticos (calos embriogênicos). Avaliou-se ainda o número médio de pró-embriões somáticos e o número médio de pró-embriões somáticos por calo embriogênico. Em todas as datas de avaliação, foram realizadas coletas de amostras para análise de microscopia de luz e para documentação fotográfica in vivo realizada através de uma câmera digital (Olympus E-330) acoplada a um microscópio estereoscópio binocular.

2.3. Análise dos dados

A homocedasticidade dos dados foi analisada pelo teste Cochran a 5% de probabilidade e a normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade. Para a análise estatística dos dados, as variâncias foram comparadas através do teste F a 5% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de oxidação, em razão da distribuição binomial (0 = ausência e 1 = presença), foram analisados em função de todas as variáveis de crescimento in vitro, usando a função ligadormalogit, sendo utilizado o modelo linear generalizado. O modelo foi escolhido com base na significância dos coeficientes, utilizando-se o teste z a 7% de probabilidade.

Para as análises estatísticas, utilizou-se o programa estatístico R, versão 3.0.3 (R Core Team, 2014) e o pacote ExpDes (Experimental Designs) (FERREIRA et al., 2013). Além da análise estatística, foi realizada uma análise descritiva dos dados, através de médias e desvios padrões.

2.4. Análise anatômica e histoquímica

Para análises anatômicas e histoquímicas pela microscopia de luz, foram coletadas amostras de calos embriogênicos na qual foram fixadas em solução de glutaraldeído (KARNOVSKY, 1965, modificado – 2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 3% sacarose, CaCl_2 5 μM em tampão cacodilato 0,1 M pH 6,8), por no mínimo uma semana, desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historresin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Para a obtenção de cortes transversais com 5 μm utilizou-se micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA). Para a caracterização estrutural, os cortes foram corados durante 10 minutos em azul de toluidina pH 4,0 (O'BRIEN; MCCULLY, 1981). Para a caracterização histoquímica, os cortes foram corados durante 10 minutos em Vermelho de Rutênio (JOHANSEN, 1940) para evidenciar pectinas. As lâminas foram montadas com Permout e as imagens capturadas utilizando fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

3. Resultados

3.1. Experimento 1

A relação entre a probabilidade de ocorrência de oxidação nos calos e o percentual de calos embriogênicos foi positiva e crescente de acordo com a função ligadora logit a 7% de probabilidade. Observa-se que à medida que o percentual de calos embriogênicos aumenta maior é a probabilidade de ocorrência de oxidação nos calos (Figura 1A). Ainda, observa-se calo embriogênico com grande parte do tecido oxidado e a presença de pró-embriões somáticos, formados de forma indireta (com calogênese no explante, precedendo a indução de pró-embriões) (Figura 3A).

Foram encontradas diferenças significativas tanto entre os tipos de meio de cultura utilizados como entre os dias de pulso de auxina para a característica percentual

de calogênese (Figura 1B). No meio semissólido, o percentual de calogênese foi de 96%, e no meio líquido, 64%. Em relação ao número de dias de pulso de auxina, observou-se que 1 e 2 dias de pulso de auxina proporcionaram médias significativas maiores no percentual de calogênese em relação a 8 dias de pulso de auxina (Figura 1B).

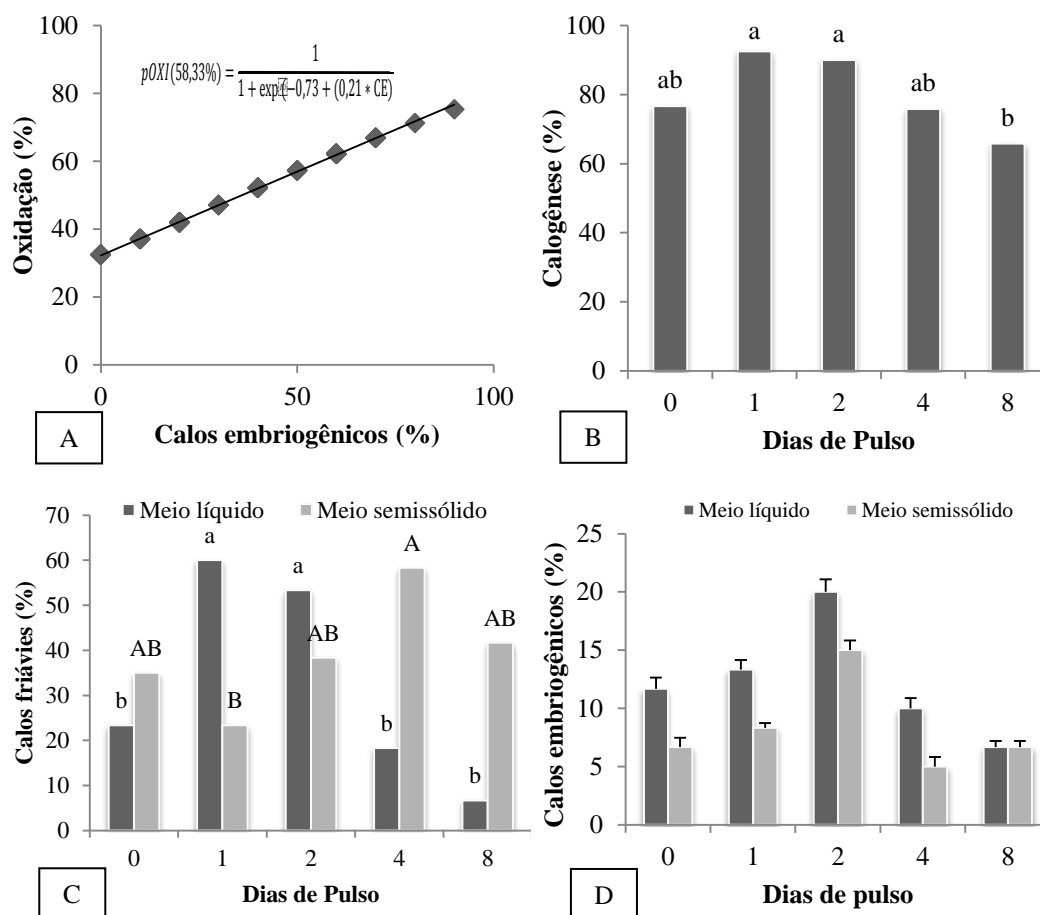


Figura 1: Probabilidade de oxidação (%) em relação ao percentual de calos embriogênicos, segundo a função ligadora Logit (A), percentual de calogênese em relação aos dias de pulso de auxina (B), percentual de calos friáveis (C) e percentual de calos embriogênicos (D) em relação aos dias de pulso de auxina e ao tipo de meio de cultura, de explantes de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* aos 30 dias. Médias contempladas com a mesma letra minúscula [entre os dias de pulso (B) para o meio líquido C] e maiúscula [entre os dias de pulso para o meio semissólido (C)] não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. As barras representam os desvios padrões.

Para o meio de cultura líquido, 1 e 2 dias de pulso de auxina proporcionaram maiores percentuais de calos friáveis do que os demais intervalos de pulso de auxina (Figura 1C). Para o meio de cultura semissólido, a média do percentual de calos friáveis aos 4 dias de pulso de auxina foi significativamente superior à média de calos friáveis à 1 dia de pulso de auxina.

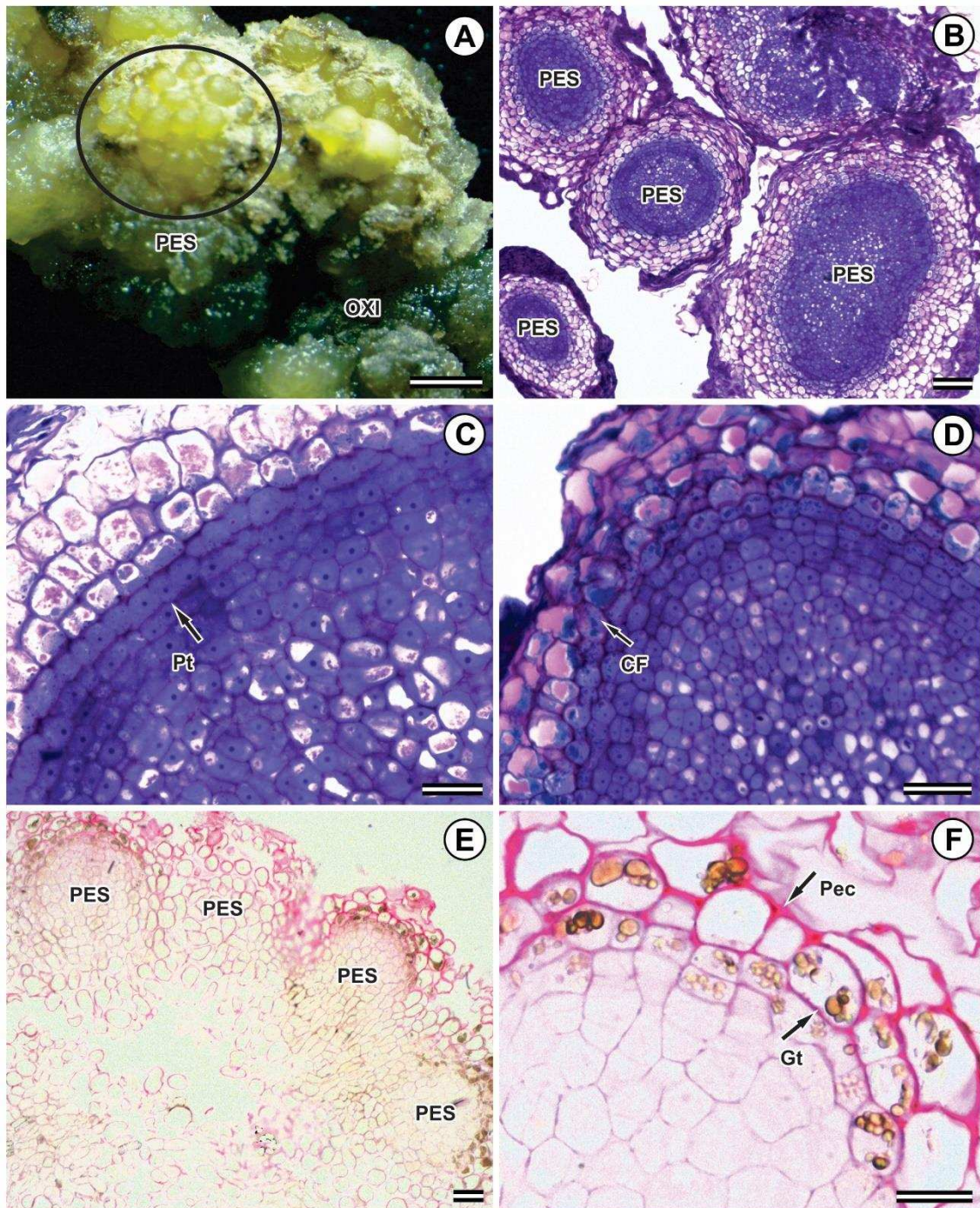


Figura 3 – Fotografia capturada por estoscopia (A), secções longitudinais obtidas por fotomicroscopia de luz (B, C, D, E e F) durante a indução de culturas embriogênicas em cotilédones de *Eucalyptu sgrandis* x *E. urophylla*, obtidas nos tempos de 30 (C), 37 (B, D, E e F) e 44 (A) dias de indução, submetidas aos tratamentos de 1 dia (E e F), 2 dias (A, B e D) e 3 dias (C) de pulso de auxina com 50 μ M de picloram. Secções transversais submetidas ao azul de toluidina (análise estrutural) (B, C e D) e ao vermelho de rutênio, com reação positiva para pectinas (E e F). CF= cordão fenólico; Gt: Gotículas de óleo; OXI: Oxidação Pec= Pectina; PES= pró-embriões somáticos; Pt: Protoderme. Barras 100 μ m (B); 50 μ m (D e E); 20 μ m (C e F); 1 mm (A).

Para a característica percentual de calos embriogênicos não foram encontradas diferenças significativas entre a interação e entre os tratamentos. Entretanto, pode-se observar na Figura 1D, tendência semelhante entre os dois tipos de meio de cultura (líquido e semissólido), em que há um crescimento no percentual de calos embriogênicos até o intervalo de 2 dias de pulso de auxina, seguido do decréscimo dessa característica a partir desse intervalo.

3.2. Experimento 2

Aos 30 dias de avaliação, a média de oxidação relativa à 1 dia de pulso de auxina foi superior à média de oxidação aos 3 dias de pulso de auxina (Figura 2A). Esse mesmo comportamento permaneceu aos 37 e 44 dias de avaliação, com o percentual de oxidação decrescendo na medida em que se aumentou o intervalo de dias de pulso de auxina (Figura 2A).

Para as características percentual de calogênese e percentual de calos friáveis, observou-se médias próximas a 100% em todos os tratamentos de pulso de auxina e em todos os intervalos de avaliação (Figuras 2B e 2C).

Na avaliação aos 30 dias para a percentual de calos embriogênicos (%ES), a média foi significativamente superior com 2 dias de pulso de auxina em relação aos demais dias testados, aos 30 dias de avaliação (Figura 2D). Para das demais datas de avaliação, 37 e 44 dias, observou-se esse mesmo comportamento, com médias aos 2 dias de pulso de auxina superiores às médias à 1 ou aos 3 dias de pulso de auxina para o percentual de calos embriogênicos (%ES) (Figura 2D).

Para as características número médio de pró-embriões somáticos (NES) e o número médio de pró-embriões somáticos/calos embriogênicos (NES/ES), observou-se comportamentos semelhantes nas três avaliações realizadas, aos 30, 37 e 44 dias de indução. Houve tendência crescente de NES e NES/ES na medida em que se aumentou o intervalo de 1 dia de pulso de auxina para 2 dias de pulso de auxina e decrescente após aumentar o pulso de auxina de 2 para 3 dias (Figuras 2E e 2F). Pode-se observar pelas Figuras 2E e 2F a ocorrência de desvios padrões de alta magnitude para as características NES e NES/ES. Essa situação já era esperada, já que os dados das características NES e NES/ES não seguem distribuição normal ($p < 0,05$ pelo teste Shapiro-Wilk). Observaram-se em ambas as características, NES e NES/ES, a ocorrência de dados discrepantes em todas as avaliações, como por

exemplo, a presença de até 32 pró-embriões somáticos em estágio globular (Figura 3A) num mesmo explante tratados com dois dias de pulso de auxina aos 44 dias de indução/avaliação.

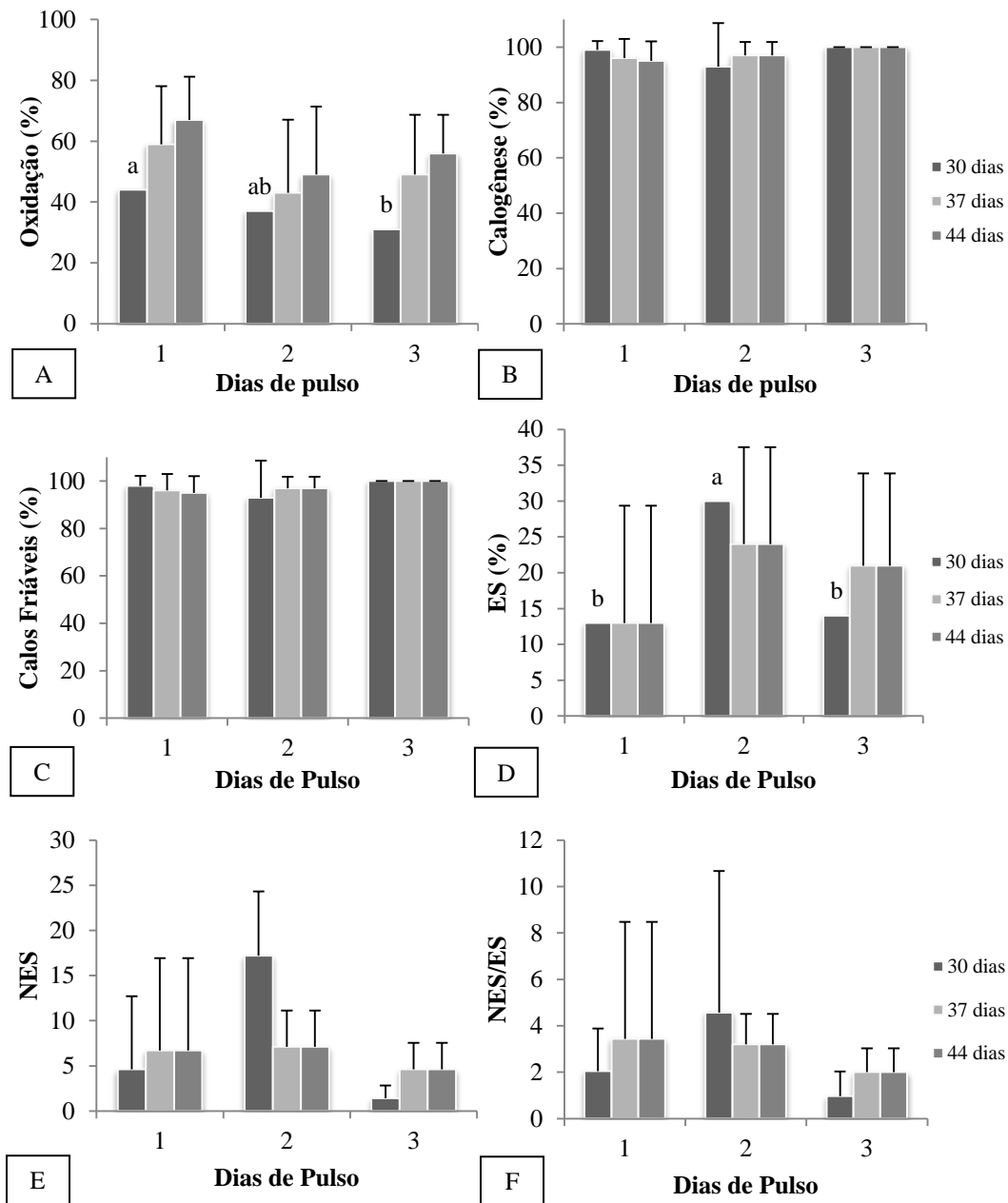


Figura 2: Porcentual de oxidação (A), porcentual de calogênese (B), porcentual de calos friáveis (C), porcentual de calos embriogênicos (ES%) (D), número médio de pró-embriões somáticos (NES) (E) e o número médio de pró-embriões somáticos por calos embriogênico (F) em relação número de dias de pulso de auxina de explantes de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* aos 30, 37 e 44 dias. As barras representam os desvios padrões das médias.

No presente trabalho foi observado que a indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* é assíncronica, pois em todos os tempos de avaliação

foi possível observar o início de desdiferenciação do explante cotiledonar para a formação de calosembriogênicos.

No geral, os pró-embriões somáticos formados nesse estudo têm aspecto brilhante e amarelado e estão no estágio globular. Os calos embriogênicos são friáveis e oxidados (Figuras 3A, 3B e 3E).

Em alguns pró-embriões somáticos observou-se início de diferenciação da protoderme, caracterizada por células organizadas adjacientemente (Figura 3C), além de presença de cordão fenólico circundando essa estrutura (Figura 3D).

Pelo teste com Vermelho de Rutênio, observou-se reação positiva para pectinas principalmente nas regiões periféricas do pró-embrião somático (Figuras 3E e 3F). Ainda no teste histoquímico com Vermelho de Rutênio, observou-se em alguns calos embriogênicos, o acúmulo de gotículas de óleo dentro de células localizadas na região periférica do pró-embrião somático (Figuras 3E e 3F).

4. Discussão

A formação de calos embriogênicos em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* normalmente é acompanhada pela oxidação do tecido calogênico, conforme observado no presente estudo, a qual foi positiva e crescente entre o porcentual de calos embriogênicos e a ocorrência de oxidação nos calos.

Em algumas espécies não lenhosas, a oxidação dos calos provoca ausência do processo embriogênico e até a morte do explante (TAKAMORI et al., 2015). Porém, em algumas outras espécies, lenhosas ou não lenhosas, pode-se observar a oxidação do tecido calogênico precedendo ou concomitante à formação de embriões somáticos, como na embriogênese somática de *Vitis vinifera* (DAI et al., 2015), de *Quercus Alba* x *Q. rubra* (MARTÍNEZ et al., 2015) e de *Mondia whitei* (BASKARAN et al., 2015). A oxidação pode ocorrer quando o explante excisado produz metabólitos secundários quando em contato com o meio de cultura, produzindo uma cor amarronzada no tecido.

No presente trabalho foi observado que a indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* é assíncrona, pois em todos os tempos de avaliação do segundo experimento (30, 37 e 44 dias) foi possível observar o início de desdiferenciação do explante cotiledonar para a formação de calos embriogênicos.

Aspecto semelhante ocorreu durante o estudo ontogênico da embriogênese somática de *Euterpe oleracea*, a partir de embriões zigóticos, sendo observada a indução de embriões somáticos em diferentes estágios de maturação, além da formação de embriogênese somática secundária (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012). Algumas células vegetais podem adquirir competência em diferentes estágios de exposição do tecido ao meio de cultura acrescido de reguladores de crescimento. Quando as células adquirem novamente atividade meristemática, são chamadas de células competentes (ROCHA et al., 2012).

A partir dos resultados do primeiro experimento realizado no presente estudo, observou-se que as respostas morfogênicas dos explantes de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* foram superiores quando se usou meio semissólido, em relação ao meio líquido e, dentro do intervalo de dias de pulso de auxina testado, entre zero e oito dias, observou-se tendência crescente de ocorrência de calos embriogênicos até dois dias de pulso, e decrescente a partir desse valor. Por esse motivo, optou-se por utilizar o meio semissólido e o intervalo de pulso de auxina de um a três dias no segundo experimento realizado nesse estudo, para comprovação dos resultados e para realização de uma análise mais detalhada, com coleta de dados e amostras em três intervalos de indução.

A indução média de calos embriogênicos foi superior no intervalo de dois dias de pulso de auxina, em relação aos outros dois intervalos testados no segundo experimento, tanto aos 30 dias, como aos 37 e 44 dias de avaliação, concordando com os resultados do primeiro experimento realizado no presente estudo.

De acordo com alguns trabalhos que também utilizaram o pulso de reguladores de crescimento na morfogênese em plantas, a duração do tratamento de pulso pode durar algumas horas ou poucos dias (PASCUAL; MARIN, 2005; SHARMA et al., 2007; SHAIK et al., 2009; GRANER et al., 2013; ZAYTSEVA et al., 2016).

Muitas vezes, o tratamento de pulso é usado no intuito de minimizar os efeitos negativos sobre a morfologia das plantas propagadas *in vitro*, onde, normalmente, há contínua exposição aos reguladores de crescimento. Essa exposição pode resultar em plantas com hiperidricidade, nanismo, fasciação, distorção de estruturas (AHMAD; ANIS, 2012) ou variação somaclonal, e o tratamento com pulso pode reduzir o tempo de exposição da planta ao regulador de crescimento (AASIM et al., 2010).

Tratamentos de pulso de auxina podem ser utilizados também no intuito de acelerar o processo morfogênico, como observado na embriogênese somática de batata, utilizando pulsos de 2,4-D (SHARMA et al., 2007).

Porém, no presente estudo, o tratamento de pulso de auxina foi testado como gatilho causador de estresse celular, provocando a desdiferenciação e rediferenciação embriogênica (FEHÉR, 2015).

Observações na embriogênese zigótica de cenoura, indicam alta concentração de auxina logo após a fertilização (RIBINICKY et al., 2002), o que enfatiza a importância de alterações temporais nos níveis de auxina endógena para a expressão de totipotência celular (FEHÉR, 2015). Estas observações sugerem que o pulso de auxina endógena pode ser um dos sinais primários para a indução da embriogênese somática (FEHÉR et al., 2003), e, sob condições controladas, pode também ser alcançada com tratamentos de pulso de auxina exógena.

Alguns autores observaram exatamente essa função para o pulso de auxina, em alfafa (DUDITS et al., 1991), cenoura (KITAMIYA et al., 2000) e batata (SHARMA et al., 2007), onde o pulso com 2,4-D foi capaz de fornecer os estímulos necessários para indução da embriogênese somática. Porém, nesses mesmos trabalhos, foram exigidos novos componentes no meio de cultura e/ou novas condições de cultivo para a maturação e germinação de embriões somáticos (DUDITS et al., 1991; KITAMIYA et al., 2000; SHARMA et al., 2007).

Dessa forma, apesar do pulso de picloram ter sido o gatilho inicial para indução de pró-embriões somáticos em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, novos estudos devem ser realizados para dar continuidade ao processo embriogênico na espécie, com a maturação, germinação e aclimação das plântulas formadas. Além disso, deve-se considerar também o fator genético, já que se utilizou explantes provenientes de sementes ou seja, vários materiais genéticos diferentes. Alguns autores já comprovaram a existência de controle genético em características referentes à embriogênese somática em algumas espécies como dendê (CORRÊA et al., 2015) e eucalipto (PINTO et al., 2007).

Pelo teste com Vermelho de Rutênio realizado no presente estudo, observou-se acúmulo de pectinas nas regiões periféricas do pró-embrião somático, regiões onde foi possível observar também o início formação da protoderme, caracterizada por células organizadas adjacientemente.

As pectinas são os componentes principais das paredes celulares primárias de todas as plantas terrestres (PILARSKA et al., 2013). Em estudos com cenoura (KIKUCHI et al., 1995) e *Medicago arborea* (ENDRESS et al., 2009) foram observadas diferenças no conteúdo de pectinas em células de calos embriogênicos e não

embriogênicos. Evidências relativas à distribuição específica dos epitopos pectínicos durante a embriogênese somática são escassas (PILARSKA et al., 2013), porém, células proliferativas ativas de calos ou aglomerados embriogênicos têm demonstrado conter grandes quantidades de pectinas reativas (KIKUCHI et al.1995; WILLATS et al. 1999; XU et al. 2011).

A presença de pectinas em regiões periféricas de pró-embriões somáticos do presente estudo poderia ser vista, então, como marcador de embriogênese somática em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

Ainda no teste histoquímico com Vermelho de Rutênio do presente estudo, observou-se em alguns calos embriogênicos o acúmulo de gotículas de óleo dentro de células localizadas na região periférica do pró-embrião somático. Essas gotículas de óleo podem estar sendo usadas pelos pró-embriões somáticos como compostos de reserva, já que, em dicotiledôneas são encontrados principalmente lipídeos e proteínas como fontes iniciais de reserva (BEWLEY; BLACK, 1994; ROCHA et al., 2012).

5. Conclusões

- Tratamentos com pulso da auxina picloram (207,02 μM) podem ser utilizados como fonte de estresse inicial para aquisição da competência embriogênica em explantes cotiledonares e *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*;
- A indução média de calos embriogênicos foi superior no intervalo de dois dias de pulso de auxina, em relação aos outros dois intervalos testados tanto aos 30 dias, como aos 37 e 44 dias de avaliação;
- A oxidação de explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* colocados pode ser considerado um indício de formação de calos embriogênicos;
- A presença de pectinas em regiões periféricas de pró-embriões somáticos pode ser vista como marcador de embriogênese somática em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

6. Referências Bibliográficas

AASIM, M.; HUSSAIN, N.; UMER, E. M.; ZUBAIR, M.; HUSSAIN, S. B.; SAEED, S.; RAFIQUE, T. S.; SANCAK, C. In vitro shoot regeneration off enugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) using different cytokinins. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 7174–7179, 2010.

AHMAD, N.; ANIS, M. An efficient and reproducible method for in vitro clonal multiplication of *Rauvolfia tetraphylla* L. and evaluation of genetic stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1739–1752, 2012.

BASKARAN, P.; KUMARI, A.; STADEN, J. V. Embryogenesis and synthetic seed production in *Mondia whitei*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, p. 205–214, 2015.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. Plenum Press, Segunda Edição, New York, London, 1994, 445 p.

CORRÊA, T. R.; MOTOYKE, S. Y.; COSER, S. M.; SILVEIRA, G.; RESENDE, M. D. V.; CHIA, G. S. Estimation of genetic parameters for in vitro oil palm characteristics (*Elaeis guineensis* Jacq.) and selection of genotypes for cloning capacity and oil yield. **Industral Crops and Products**, n. 77, p.1033-1038, 2015.

DAI, L.; ZHOU, Q.; LI, R.; DU, Y.; HE, J.; WANG, D.; CHENG, S.; ZHANG, J.; WANG, Y. Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, p. 397–412, 2015.

DUDITS, D.; BOGRE, L.; GYORGYEY, J. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro. **Jornal of Cell Science**, v. 99, p. 475–484, 1991.

ENDRESS, V.; BARRIUSO, J.; RUPEREZ, P.; MARTIN, J. P.; BLAZQUEZ, A.; VILLALOBOS, N.; GUERRA, H.; MARTIN, L. Differences in cell wall polysaccharide composition between embryogenic and nonembryogenic calli of *Medicago arborea* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 97, p. 323–329, 2009.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress –induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p.385-402, 2015.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 74, p. 201–228, 2003

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: Experimental Designs package. R package version 1.1.2.**, 2013. 42 p.

GRANER, E. M.; OBERSCHELP, G. P.; BRONDANI, G. E.; BATAGIN-PIOTTO, K.D.; ALMEIDA, C. V.; ALMEIDA, M. TDZ pulsing evaluation on the in vitro morphogenesis of peach palm. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, p. 283–288, 2013.

GUERRA, M. P.; DAL-VE스코, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeiraserrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 117-128, 2001.

JAIN, S. M. An update on overall recent progress on somatic embryogenesis in forest trees. In: SUZUKI, K.; ISHII, K.; SAKURAI, S.; SASAKI, S. (eds) **Plantation technology in tropical forest science**. Springer, Tokyo, p. 113-122, 2006.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York; London : McGraw-Hill Book Company, 1940, 523p.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KIKUCHI, A.; SATOH, S.; NAKAMURA, N.; FUJII, T. Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non embryogenic calli. **Plant Cell Reports**, v. 4, p. 279–284, 1995.

KITAMIYA, E.; SUZUKI, S.; SANO, T.; NAGATA, T. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 551–557, 2000.

KOEHLER, A.D.; CARVALHO, C. R.; ABREU, I. S.; CLARINDO, W. R.. Somatic embryogenesis from leaf explants of hermaphrodite *Carica papaya*: A new approach for clonal propagation. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 2386, 2013.

MARTINEZ, M.T.; VIEITEZ, A. M.; CORREDORIA, E. Improved secondary embryo production in *Quercus alba* and *Q. rubra* by activated charcoal, silver thiosulphate and sucrose: influence of embryogenic explant used for subculture **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, p. 531–546, 2015.

MERKLE, S. A. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 1, p. 112-121, 1995.

MURALIDHARAN, E. M.; GUPTA, P. K.; MASCARENHAS, A. F. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 41-43, 1989.

MURALIDHARAN, M.; MASCARENHAS, A. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: JAIN, S.; GUPTA, P.; NEWTON, R. (eds) **Somatic embryogenesis in woody plants**, v. 2, Kluwer, Dordrecht, p. 23-40, 1995.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15:473–497, 1962.

O'BRIEN, T. P.; MCCYLLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Termarcarphi OPTY. LTD: Melbourne, 1981. 357 p.

PASCUAL, L.; MARIN, J. A. A liquid 2,4-D pulse increased shoot and root regeneration from leaf explants. **Scientia Horticulturae**, v. 106, p. 582–592, 2005.

PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; GERALDINE, R. M.; GONÇALVES, L. A.; OTONI, W. C.; DIAS, L. L. C.; NEVES, D. A.; ODA, S. Growth regulators pulsing pre-treatment effect on the *Eucalyptus grandis* shoot and adventitious root morphogenesis. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v. 2, n. 1, p. 20-28, 2006.

PILARSKA, M.; KNOX, J. P.; KONIECZNY, R. Arabinogalactan-protein and pectin epitopes in relation to an extracellular matrix surface network and somatic embryogenesis and callogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 115, p. 35–44, 2013.

PINTO, G.; PARK, E. Y. S.; NEVES, E. L.; ARAÚJO, E. C.; SANTOS, E. C. Genetic control of somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globules* Labill. **Plant Cell Reports**, n; 27, p.1093-1101, 2008.

PINTO, G.; PARK, Y. S.; LOUREIRO, J.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SILVA, S.; SANTOS, C. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus* – an update to 2009. **Applications of Plant Biotechnology**, p. 67-88, 2009.

PINTO, G.; SANTOS, C.; NEVES, L.; ARAÚJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 3, p. 208-213, 2012.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível: <http://www.Rproject.org/>. 2014.

RIBNICKY, D. M.; COEHN, J. D.; HU, W. S.; COOKE, T. J. An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. **Planta**, v. 214, p. 505–509, 2009.

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v. 249, p.747-758, 2012.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.; GUEDES, R. S.; SILVA, R.; FERMINO, P.; LUIS, Z.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.109, p.501-508, 2012.

SHAIK, N. M.; ARHA, M.; NOOKARAJU, A.; GUPTA, S. K.; SRIVASTAVA, S.; YADAY, A. K.; KULKAMI, P. S.; ABHILASH, O. U.; VISHWAKARMA, R. K.; SINGH, S.; TATKARE, R.; CHINNATHAMBI, K.; RAWAL, S. KK; KHAN, B. M. Improved method of in vitro regeneration in *Leucaena leucocephala* – a leguminous pulpwood tree species. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 15, p. 311–318, 2009.

SHARMA, S. K.; BRYAN, G. J.; MILLAM, E. S. Auxin pulse treatment holds the potential to enhance efficiency and practicability of somatic embryogenesis in potato. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 945–950, 2007.

TAKAMORI, L. M.; NETO, N. B. M., VIEIRA, L. G. E.; RIBAS, A. F. Optimization of somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration of *Urochloa* species using picloram. **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, v. 51, p. 554–563, 2015.

WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; TERMIGNONI, R.; JAIN, S. M. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii*. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. v.5. p.63-78.

WILLATS, W. G. T.; STEELE-KING, C. G.; MARCUS, S. E.; KNOX, J. P. Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. **The Plant Journal**, v. 20, p. 619–628, 1999.

XU, C.; ZHAO, L.; PAN, X. S.; AMAJ, J. Developmental localization and methylesterification of pectin epitopes during somatic embryogenesis of banana (*Musa* ssp. AAA). **Plos One**, v. 6, p. 22992, 2011.

ZAYTSEVA, Y. G.; POLUBOYAROVA, T. V.; NOVIKOVA, T. I. Effects of thidiazuron on in vitro morphogenic response of *Rhododendron sichotense* Pojark. and *Rhododendron catawbiense* cv. Grandiflorum leaf explants **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, v. 52, p. 56–63, 2016.

GENETIC CONTROL AND SELECTION FOR IN VITRO PROPAGATION

CHARACTERISTICS OF *Eucalyptus* HYBRID CLONES

Abstract: In addition to the selection of clones with high production capacity, fast growth, disease resistance, among other objectives, the high induction capacity of somatic embryos by clones should be considered. Here, we aimed at estimating the genetic correlation between the induction characteristics of somatic embryos, besides studying the genetic control related to them, to ascertain its usefulness in the selection of genotypes with differential embryogenic competence. Leaf explants from ten micropropagated *Eucalyptus* clones were cultured on medium added with either Dicamba or Picloram, at different concentrations. We evaluated the callus induction potential and the somatic pre-embryos produced which was categorized into high, medium or low. Genetic control of the traits were assessed via the likelihood ratio test (LRT, a procedure analogous to ANOVA), which is suitable to unbalanced data sets. Estimates of genetic parameters and heritabilities of the variables were obtained by the variance components estimation procedure via residual maximum likelihood and the genetic values prediction via best linear unbiased prediction. As principal result, we observed the somatic pre-embryos produced under genetic control. In addition, high and positive genetic correlation between the somatic pro-embryos produced and the callus induction in medium level indicates that selection for the first feature should lead to consistent responses in the second. Finally, the triple hybrids [(*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) x *E. viminalis*] had higher genetic values compared to the other hybrids assessed, indicating greater ease in inducing somatic embryogenesis in this species.

Keywords: Somatic embryogenesis, tissue culture, forest breeding, clonal forestry.

1. Introduction

The remarkable intraspecific genetic variation and its wide adaptability have led to *Eucalyptus* being the most planted tree worldwide, with Brazil holding of 5.6 million hectares of planted forests, of which an estimated 3.7 million are clonal forests (IBÁ, 2016). It is noteworthy that the adoption of cloning techniques have contributed to reach this situation. The cloning process involves the stages of selection, recovery and amplification of genetic material, clonal tests, pilot planting and commercial

multiplication of superior matrices, the mini-cutting technique currently being the clonal seedling production process most used by forestry companies (Xavier et al. 2013).

Clonal propagation has an important role through tissue culture, where the goal is to select multiple elite genotypes containing desirable characteristics, and then propagate them in mass, forming uniform commercial plantations (Nugroho et al. 2014). As a plant production alternative, tissue culture and micropropagation through somatic embryogenesis has been the subject of various research works (Xavier et al. 2013). These biotechnological techniques, combined with genetic transformation, unite with conventional breeding, allowing to obtain more productive genotypes (Sartoretto et al. 2008) meeting the demand for quality products with low production cost.

There are several advantages of somatic embryogenesis in clonal forestry, such as high-yield production required to reduce production costs; embryogenic culture maintenance, practically indefinitely, via cryopreservation techniques; facilitation of decision-making in the rapid implementation of appropriate clones due to climate change; ability to manage the genetic diversity and genetic gain in the plantation (Pinto et al. 2007, Corrêa et al. 2015); and mass production of selected clones where the seed source is relatively small (Nugroho et al. 2014). Park et al. (2006) pointed out that the biggest advantage of somatic embryogenesis, in forestry, is the deployment of genetically tested trees, preferably integrated into clonal forestry programs. The technique thus serves as a way of rejuvenating clones with features of interest, but has disadvantages such as low rooting and plagiotropic seedling growth percentage (Xavier et al. 2013).

However, low embryogenic initiation rates observed in *Eucalyptus* species (Muralidharan and Mascarenhas 1995, Watt et al. 1999, Pinto et al. 2002), disability or low capacity of somatic embryos to reach full maturity and germinate (Muralidharan et al. 1989, Muralidharan and Mascarenhas 1995, Prakash and Gurumurthi 2010) and the occurrence of somaclonal variation (Merkle 1995, Jain 2006) may limit or disable the adoption of somatic embryogenesis as a commercial technique, or as vegetative propagation technique in forest breeding programs, and these barriers limit the number of genotypes used.

Given the difficulties encountered in the propagation through somatic embryogenesis, many studies have been conducted to improve the efficiency of this technique, as well as to select promising clones/ families (Merkle 1995, Pullman et al.

2003, Lelu-Walter et al. 2006, Pinto et al. 2008, Priyono et al. 2010, Nugroho et al. 2014, Corrêa et al. 2015).

It is well-known that a number of factors can ultimately modify the morphogenetic responses, i.e. somatic embryogenesis, in cultured cells and tissues in explants. Plant cells with diverse morpho-physiological conditions interact with the medium components and the microenvironment, and express their regenerative potential, within the limits set by genetic and epigenetic restrictions. On top of that, the transition from somatic cells to a competent state involves a wide repertoire of genes, linked to complex expression patterns orchestrated by a gene regulatory network (Fehér et al. 2003, Karami et al., 2009, Fehér 2015, Altamura et al. 2016).

The genetic influence in the process of somatic embryogenesis is clearly proven by the success of the embryonic gene transfer capacity between the embryogenic and recalcitrant genotypes via crossing (Kielly and Bowley 1992, Moltrasio et al. 2004). Understanding the genetic control is an important requirement in improving the somatic embryogenesis process. Some authors have emphasized that the somatic embryogenesis induction phase is that with greater possibility of genetic gain with selection (Pullman et al. 2003, Lelu-Walter et al. 2006, Fehér 2015, Nugroho et al. 2014, Corrêa et al. 2015).

Thus, besides the selection of clones with high production capacity, fast growth and disease resistance, among other objectives, the high induction capacity of somatic embryos per clone should be considered. The aim of this study was to estimate the genetic correlation among the induction characteristics of somatic embryos, as well as besides studying the genetic control related to them to ascertain its usefulness in the selection of genotypes with embryogenic competence.

2. Materials and Methods

2.1. Induction of somatic embryogenesis and data collection

Leaf explants of 10 micropropagated Eucalyptus clones were inoculated into sterile polystyrene disposable Petri dishes (60 x 15 mm) containing 15 mL of MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented full-strength of salts and vitamins, 100 mgL⁻¹ of myo-inositol, 3% sucrose and 2.8 gL⁻¹ of Phytigel® (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) with pH adjusted to 5.8. Eight different auxin concentrations were added to the culture medium: 4.52, 9.05, 18.10 or 36.20 µM of 3,6-dichloro-o-anisic acid (Dicamba) or 20.71, 41.41, 82.83 or 165.66 µM of 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic

acid (Picloram), both purchased from Sigma-Aldrich. The explants were maintained in culture in a dark room at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. The clones used were provided by the Brazilian pulp and paper companies CENIBRA and CMPC, and are described in Table 1. We used the randomized block design in a factorial 10 x 8 (ten clones and eight auxin concentrations) with 6 blocks and 10 explants/plot.

Table 1: Identification number of clones and their genetic origins (species used for obtaining hybrid).

Clone	Genetic origins
C1	<i>Eucalyptus urophylla</i>
C2	Hybrid of <i>E. urophylla</i>
C3	Hybrid of <i>E. urophylla</i>
C4	Hybrid of <i>E. urophylla</i> x <i>E. globulus</i>
C5	Hybrid of <i>E. urophylla</i> x <i>E. globulus</i>
C6	Hybrid of <i>E. urophylla</i> x <i>E. globulus</i>
C7	Hybrid of <i>E. grandis</i> x <i>E. globulus</i>
C8	Hybrid of (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) x <i>E. viminalis</i>
C9	Hybrid of (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) x <i>E. viminalis</i>
C10	Hybrid of (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) x <i>E. viminalis</i>

At 40 days we evaluated the percentage of explants that produced somatic pre-embryos (%SPE), the percentage of explant formation from callogenesis (%CAL), the total callogenesis percentage being divided into high (%HC), medium (%MC) or low (%LC), besides the collection of plant material for structural analysis and photographic documentation. The percentages were obtained by counting the number of explants callus containing callus or somatic pro-embryos among the ten initial explants.

To obtain the slides for examination by light microscopy, specimens were fixed in glutaraldehyde solution (Karnovsky 1965 modified: 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 3% sucrose, CaCl_2 5 μM in cacodylate buffer 0.1 M and pH 6.8) for at least a week, dehydrated in an ethanol series and embedded in methacrylate (Leica Historesin, Leica Biosystems Nussloch GmbH, and Germany). To obtain transverse and longitudinal cuts to 5 μm we used an automatic feed rotary microtome (RM 2255, Leica Biosystems) equipped with a glass blade.

The sections were stained with toluidine blue at pH 4.4 (O'Brien and McCully 1981) for ten minutes, and the slides mounted with synthetic resin (Permount, Fisher Chemical™, USA). The analysis and photographic documentation were performed under light microscope (Olympus AX-70, Japan), connected to a photomicrography system (Olympus U-Photo, Japan), on Plant Anatomy Laboratory in Department of Plant Biology of the Federal University of Viçosa -UFV.

2.2. Estimates of genetic parameters and correlations

Genetic control of the traits were assessed via the likelihood ratio test (LRT, a procedure analogous to ANOVA), which is suitable to unbalanced data sets. Estimates of genetic parameters and heritabilities of the variables were obtained by the variance components estimation procedure via residual maximum likelihood (REML) and the genetic values prediction via best linear unbiased prediction (BLUP) using the Selegen-Reml/Blup program that performs variance analysis, estimation and prediction (Resende 2002). We used the linear mixed model for the design of complete blocks considering various mediums (types and concentrations of auxin) and a single observation per plot, as follows:

$$\mathbf{y}=\mathbf{Xr}+\mathbf{Zg}+\mathbf{Wi}+\mathbf{e},$$

where, \mathbf{y} = data vector; \mathbf{r} = vector of repetition effects (assumed to be fixed) added to the overall average; \mathbf{g} = vector of genotypic effects of clones (assumed to be random); \mathbf{i} = vector of the effects of genotype x medium interaction (random); and \mathbf{e} = value of errors or residuals (random). The capital letters represent the incidence matrices for these elements.

With the estimated genetic parameters, the rankings of the genotypes were obtained considering all mediums together and genotype x medium interaction, in addition to genetic correlations among the variables evaluated. Genetic correlations were tested by the test t at 1 and 5% probability.

3. Results

3.1. Structural analysis

Regarding callus formation from explants, we considered explants with high (Fig. 1A), medium (Fig. 1B) and low (Fig. 1C) callus formation. In Figs. 1D and 1E,

somatic pre-embryos (SPE) are observed, induced indirectly by proliferation of disorganized cells (callus) preceding their formation (Figs. 1B and 1C). The induced SPE stand out because they have bright yellow color, and there was a protoderm differentiation, characterized by contiguously arranged cells (Figs. 1D and 1E), but without their maturation or germination, and therefore considered as SPE.

3.2. Genetic control of the traits

Genetic control of the traits were assessed via the likelihood ratio test (LRT, a procedure analogous to ANOVA), which is suitable to unbalanced data sets. Results are presented in Table 2 and revealed significant effects for genotypes and genotypes X medium for all traits. This means the traits are under genetic control and also interact with the culture medium (auxin dosage).

3.3. Estimation of genetic parameters

In this study, the heritability of individual plants in the broad sense (h^2g) for %SPE, %HC, %MC and %LC were moderate (0.49, 0.44, 0.26 and 0.45, respectively) (Table 3), which features a considerable genetic control of these characteristics. The accuracy of estimates of clonal values found for the characteristics were %SPE: 0.98, %HC: 0.98, %MC: 0.95 and %LC: 0.98 (Table 3). Regarding the overall averages, the callus induction percentage was high, 93.6%, while the percentage of explants with somatic pre-embryos was low 12% (Table 3).

3.4. Genetic correlations

Regarding the genetic correlations among characteristics studied, there was high positive genetic correlation between callus formation percentage in middle level (%MC) and percentage of explants with somatic pre-embryos (%SPE) and between percentage of callus formation (% CAL) and callus formation percentage in the low level (%LC) (Table 4). All other characteristics presented low or negative correlations among themselves. All genetic correlations were significant at 5 or 1% probability's t test, with the exception to %SPE and %CAL (Table 4).

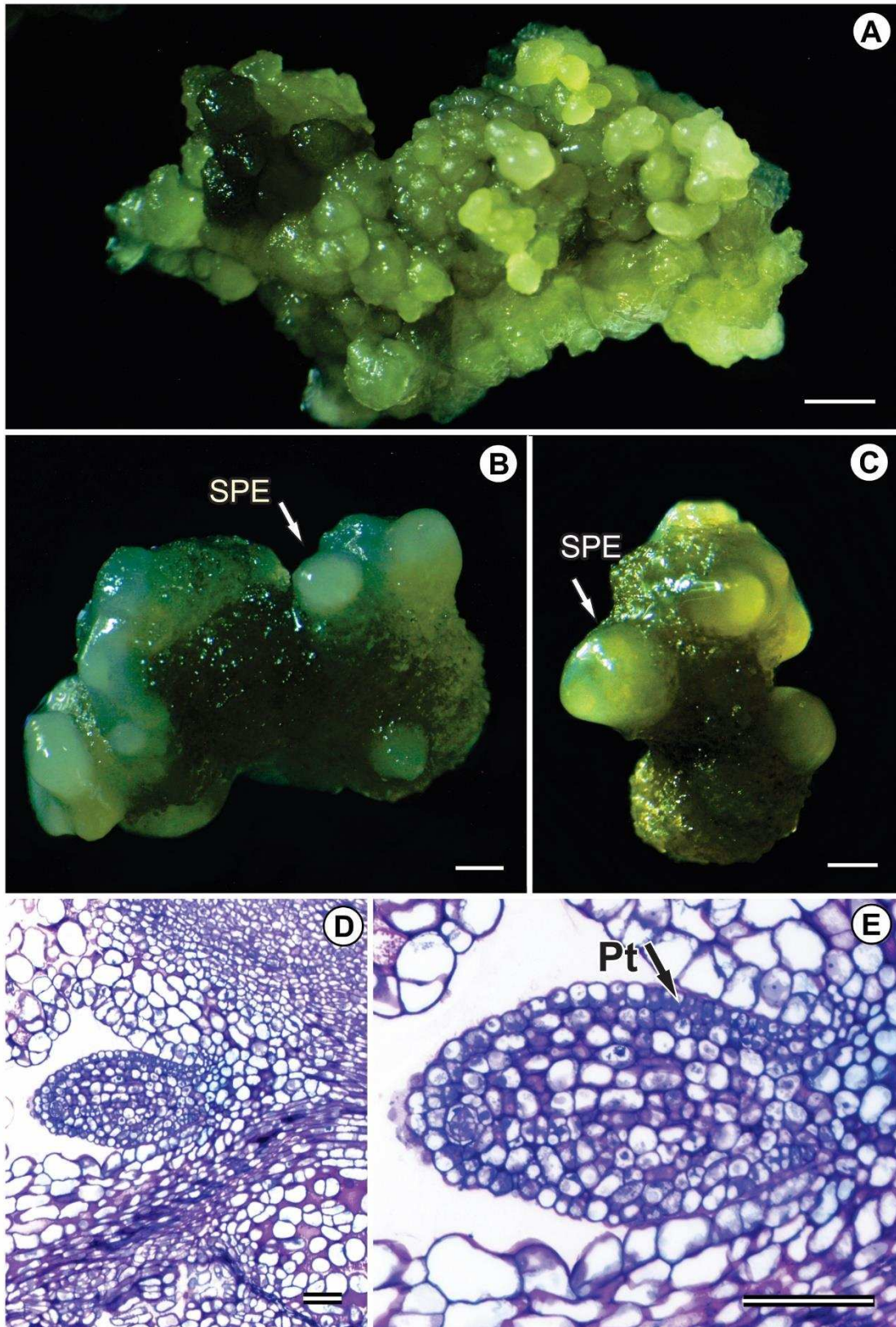


Figure 1: Leaf explants representing high callus formation (A) medium callus formation (B) and low callus formation (C); somatic pre-embryos (SPE) with protoderm (Pt) (D and E), all from the hybrid clone C8 (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) x *E. viminalis*, induced in culture medium with picloram $82.83\mu\text{M}$ at 40 days. The bars are equal to 1mm (A, B and C) or $100\mu\text{m}$ (D and E).

Table 2: Analysis of variance through likelihood ratio test (LRT), using the chi-square statistics of Eucalyptus genotypes data, after 40 days of in vitro culture, in relation to the percentage of explants with somatic pre-embryos (%SPE), callus formation (%CAL) and high (%HC), medium (%MC) and low (%LC), callus formation levels.

Variation Source	%SPE	%CAL	%HC	%MC	%LC
Genotypes	63.56**	9.82**	69.90**	33.59**	65.47**
Genotypes x Medium	41.68**	86.22**	14.34**	22.27**	18.51**

** significant by the chi-square statistics at level of 1% of probability of type I error.

Table 3: Genetic parameter estimates obtained from analysis of ten Eucalyptus genotypes after 40 days of in vitro culture, in relation to the percentage of explants with somatic pre-embryos (%SPE), callus formation (%CAL) and high (%HC), medium (%MC) and low (%LC), callus formation levels.

Parameter	%SPE	%CAL	%HC	%MC	%LC
Vg	71.24	29.59	521.17	206.00	267.77
Vint	18.60	64.60	86.62	102.32	53.32
Ve	56.34	110.04	544.23	482.41	293.83
Vf	146.19	204.24	1152.02	790.83	605.03
h²g	0.49 ± 0.09	0.14 ± 0.05	0.45 ± 0.09	0.26 ± 0.06	0.44 ± 0.09
Acgen	0.98	0.86	0.98	0.95	0.98
M	12.00	93.60	31.12	41.64	18.85

Vg: genotypic variance; Vint: variance of genotype x medium interaction; Ve: residual variance; Vf: individual phenotypic variance; h²g: heritability of individual parcels in the broad sense (the total genotypic effects); Acgen: genotype selection accuracy assuming complete survival; M: general mean of the experiment.

Table 4: Genetic correlations obtained from the analysis of ten Eucalyptus genotypes, after 40 days of in vitro culture, in relation to the percentage of explants with somatic pre-embryos (%SPE), callus formation (%CAL) and high (%HC), medium (%MC) and low (%LC) levels of callus formation.

	%SPE	%CAL	%HC	%MC
%CAL	0.07 ^{ns}			
%HC	-0.40**	-0.66**		
%MC	0.63**	0.43**	-0.74**	
%LC	-0.17**	0.62**	-0.71**	0.09*

^{ns}No significant values; *significant at 5%; **significant at 1% by t teste.

3.5. Ranking of the genotypes and auxins

The superiority of the hybrid (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) x *E. viminalis* indisputable in relation to the other species and hybrids studied in this paper regarding the %SPE characteristic, since the three genotypes representatives of this hybrid occupy the first three ranking positions considering joint analysis between mediums (Table 5).

When considering each medium, C9 and C10 clones of the (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) x *E. viminalis* hybrid appear first in all auxin types and concentrations, with the exception of Medium 7 (Picloram 82.83 μ M) where the C2 is in the first position (Table 6).

In Table 7 presents the genotype x medium interactions and species x medium. Two of the three clones of hybrid *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* had better performance for SPE induction in Medium 7 (C4 and C5), showing species x medium interaction. However, the third genotype of that hybrid (C6), showed greater genetic value in Medium 8, showing genotype x medium interaction.

All the hybrid clones *Eucalyptus urophylla* (C2 and C3) and those of the triple hybrid (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) x *E. viminalis* (C8, C9 and C10), used in the present study had a better performance in Medium 7 (Table 7). Picloram was the most efficient in inducing SPE, regardless of *Eucalyptus* species or clone used (Table 7).

Table 5: Ranking of the genotypic values (g) genetic means (u + g) and predicted gains for the percentage of explants with somatic pre-embryos (%SPE) of ten *Eucalyptus* genotypes, after 40 days of in vitro culture, considering joint analysis between mediums (auxin concentration and type).

Genotype	G	u+g	Gain	New mean
9	11.21	23.22	11.21	23.22
10	10.84	22.84	11.03	23.03
8	7.00	19.01	9.68	21.69
6	5.81	17.82	8.72	20.72
2	0.99	12.99	7.17	19.18
4	-3.80	8.21	5.34	17.35
3	-5.80	6.20	3.75	15.76
1	-6.78	5.23	2.40	14.44
5	-9.22	2.79	1.14	13.15
7	-10.25	1.75	0.00	12.01

Table 6: Top genotypic values and predicted values for the percentage of explants with somatic pre-embryos (%SPE) among ten genotypes of Eucalyptus, after 40 days of in vitro culture, considering each medium (auxin type and concentration).

Medium	Auxin (μM)	Genotype	Gain	New mean
1	4.52	10	13.82	23.49
2	Dicamba	9	14.02	23.25
3		9	12.58	24.31
4		10	13.12	23.52
5	20.71	10	13.65	23.58
6	Picloram	9	10.35	24.44
7		2	14.51	29.84
8		9	8.41	24.08

Table 7: Top mediums (auxin type and concentration) for each Eucalyptus genotype considering genotypic values and predicted values for the percentage of explants with somatic pre-embryos (%SPE), after 40 days of culture in vitro

Genotype	Medium	Auxin (μM)	Gain	New mean
1	6	Picloram (41.41)	5.37	19.46
2	7	Picloram (82.83)	14.51	29.84
3	7	Picloram (82.83)	6.44	21.78
4	8	Picloram (165.66)	6.46	22.12
5	8	Picloram (165.66)	1.42	17.08
6	7	Picloram (82.83)	8.61	23.94
7	8	Picloram (165.66)	0.00	15.67
8	7	Picloram (82.83)	10.36	25.69
9	7	Picloram (82.83)	12.35	27.68
10	7	Picloram (82.83)	11.51	26.84.

4. Discussion

4.1. Genetic control and parameters

As the genetic control of the traits revealed significant effects for genotypes and genotypes x medium for all traits, it can be inferred that the traits are under genetic control and so the heritabilities are significantly higher than zero and can be discussed.

According to Resende (2002), the individual heritability can be classified into: low ($h^2g < 0.15$), medium or moderate ($0.15 < h^2g < 0.50$) and high ($h^2g > 0.50$).

Heritability is the genetic parameter of greatest importance and application in plant breeding programs. Its relevance lies in being able to show how the genetic effects are present in an individual phenotype, it is the genotypic value of interest and influences the next generation (Falconer and Mackay, 1996). For Resende (2002), most quantitative characteristics of economic importance have individual heritability of around 20%. Similar to this study, Pinto et al (2008) found a heritability of 0.44 for the induction of somatic embryos in sib families of *Eucalyptus globulus*.

Moderate to high heritability values, such as those found in this present study, indicate that there is a possibility of genetic gains at the same rate, with the selection of clones intended for somatic embryogenesis. According to some studies, the induction phase of somatic embryogenesis is that with greater possibility of genetic gain with selection (Pullman et al. 2003, Mackay et al. 2006, Lelu-Walter et al. 2006, Nugroho et al. 2014, Corrêa et al. 2015).

The possibility of genetic gains by selection is based on the genetic variability within and between species of the same genus. Several studies demonstrate the high genetic variability of the *Eucalyptus* genus, between and within species (Caixeta et al. 2003, Silva 2010, Santos 2012), one of the reasons for the widespread cultivation of this species for commercial purposes.

Genetic variability is the main factor to be considered in a breeding program, since, without it, the selection gains become nonexistent. As an example, we can mention the palm population studied by Gomes Jr et al. (2015), which has low heritability and genetic variability, that showed no expectation of high yield with selection for the characteristics. In contrast, embryogenic strains of genotypes of the same species studied by Correa et al. (2015) showed genetic control.

According to the classification of heritability and accuracy in terms of magnitude and their associations, proposed by Resende (2002), the values found in this study are considered high magnitude, indicating advantage for performing selection using these characteristics. Selective accuracy shows a correlation between true and predicted breeding values, and the higher its value, the more there is full confidence in the assessment of individuals. The accuracy is closely linked to the heritability of the characteristic (Resende et al. 2012).

The use of methodologies that provide highly accuracy, such as those based on the mixed linear models REML/BLUP permit obtaining highly accurate estimates of genotypic values or average genotypic progenies, as well as additive genetic values and

genotype values of individuals, thus being of great use in genetic enhancement (Gomes Jr. et al. 2015).

Regarding the overall averages, the low somatic pre-embryo rates in some genotypes may be related to the recalcitrance of genotypes to spread via somatic embryogenesis. The recalcitrant genotypes can restrict clone propagation as somatic embryos (Becwar1990).

4.2. Genetic correlations

High and positive correlations suggest that selection for one characteristic should lead to consistent responses in other characteristics. In this study, there was high positive correlation between callus formation and induction of somatic pre-embryos. This information makes perfect sense, given that the callus formation is an important step for the success of somatic embryogenesis in *Eucalyptus*, which usually occurs indirectly, with the formation of a disorganized mass of cells (callus), preceding the formation of the embryo (Termignoni et al. 1996, Pinto et al. 2002, Titon et al. 2007). In practice, the positive correlation between %MC and %SPE is advantageous, since the percentage of explants with callus formation in the middle level is an easier characteristic to be assessed in relation to the percentage of explants with somatic embryos.

All other characteristics have low or negative correlations with each other. Most studies indicate that there is no clear correlation between the different phases of in vitro culture (Tyankova and Zagórska 2001). This is evidence that the different stages are controlled by different genes or combinations of genes (Tyankova and Zagórska 2001). Henry et al. (1994) studied the activity of wheat chromosome arms at different stages of somatic embryogenesis. These authors observed that different arms or set of chromosomal arms act in the phase control, such as callus induction and meristematic regions, callus differentiation and embryo formation and embryo quality and plant regeneration. Fehér (2015), in his recent review, discusses several genes and transcription factors involved in the various stages of somatic embryogenesis, as well as the remodeling of chromatin, an event responsible for the expression and silencing of specific genes at each stage.

4.3. Ranking of the genotypes and auxins

The superiority of hybrid (Eucalyptus grandis x E. urophylla) x E. viminalis is indisputable in relation to other species and hybrids studied in this work when it comes to the %SPE characteristic. This could be because a greater number of species in controlled crossings provide greater stability to the genetic materials produced among different environments (Santos et al. 2013).

The auxin picloram, was the most efficient in inducing SPE, regardless of species or clone used in this study. Titon et al. (2007) obtained somatic embryos at various stages of development using picloram 20.71 μ M and juvenile material of Eucalyptus grandis. In some cases, picloram has been shown to be more effective than others auxins for somatic embryo formation, proliferation, and maintenance in a variety of species (Perl et al. 1995, Groll et al. 2001, Perrin et al. 2004, Karamiet al. 2007, Gerdakaneh and Zohori 2013, Duet al. 2014, Dai et al. 2015, Takamori et al. 2015).

Picloram is a synthetic regulator of the pyrimidines group commonly used as a herbicide (Cobb 1992). At the cellular level, auxin regulates division, cell expansion and differentiation. Depending on the specific tissue, auxin can promote axial elongation, lateral expansion or isodiametric expansion (Taiz et al. 2015). In addition, synthetic auxins act indirectly by disrupting the metabolism of endogenous auxin, promoting cell reorganization and inducing somatic embryogenesis (Fehér et al. 2003). In a recent study of Arabidopsis thaliana mutants, Karunarathna (2015) suggests that Picloram can operate slightly differently compared to auxins such as IAA, 2,4-D and NAA.

5. Conclusions

The percentage of somatic pre-embryos (%SPE) is under genetic control;

High and positive genetic correlation between %SPE and %MC indicates that selection for the first feature should lead to consistent responses in the second;

Triple hybrids used in this study had higher genetic values for %SPE when compared to the other hybrids studied. This indicates greater ease in inducing somatic embryogenesis.

6. References

IBÁ, Indústria Brasileira de Árvores. Anuário estatístico: ano base 2015. <http://www.iba.org/pt>. Accessed 29 August 2016.

Altamura MM, Rovere FD, Fattorini L, D'Angeli S, Falasca G (2016) Recent advances on genetic and physiological bases of in vitro somatic embryo formation. In: Germaná MA, Lambardi M eds) In vitro embryogenesis in higher plants, Methods in Molecular Biology, Springer: New York. Pp 47-85.

Becwar MR, Nagmani R, Wann SR (1990) Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). The Canadian Journal of Research 20:810-817. doi:10.1139/x90-107.

Caixeta RP, Carvalho D, Rosado SCS, Trugilho PF (2003) Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectadas por meio de marcadores moleculares. Revista Árvore 27:357-363. doi: 10.1590/S0100-67622003000300012.

Cobb A (1992) Auxin-type herbicides. In: Cobb A (ed) Herbicides and plant physiology. Chapman & Hall, London, pp82-106.

Corrêa TR, Motoyke SY, Coser SM, Silveira G, Resende MDV, Chia GS (2015) Estimation of genetic parameters for in vitro oil palm characteristics (*Elaeis guineensis* Jacq.) and selection of genotypes for cloning capacity and oil yield. Industrial Crops and Products 77:1033-1038. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.09.066.

Dai L, Zhou Q, Li R, Du Y, He J, Wang D, Cheng S, Zhang J, Wang Y. (2015) Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 121:397-412 doi: 10.1007/s11240-015-0711-9.

Du L, Lou Q, Zhang X, Jiao S, Liu Y, Wang Y (2014) Construction of flower-specific chimeric promoters and analysis of their activities in transgenic torenia. *Plant Molecular Biology Reporter* 32:2342-245. doi: 10.1007/s11105-013-0646-4.

Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to quantitative genetic*, 4 ed. Essex, Longman.

Fehér A (2015) Somatic embryogenesis – stress –induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1849:385-402. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.07.005.

Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:201-228. doi:10.1023/a:1024033216561.

Gerdakaneh M, Zohori M (2013) The effect of picloram on somatic embryogenesis of different explants of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *British Biotechnology Journal* 3:133-142. doi: 10.9734/BBJ/2013/2370.

Gomes Junior RA, Lopes SR, Cunha RNV, Pina AJA, Silva MP, Resende MDV (2015) Características vegetativas na fase juvenil de híbridos interespecíficos de caiaué com dendezeiro. *Revista Ciência Agrária* 58:27-35. doi: 10.4322/rca.1590.

Groll J, Mycock D, Gray V, Laminski S (2001) Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65:201-210. doi: 10.1023/a:1010622424627.

Henry Y, Marcotte JL, De Buyser J (1994) Chromosomal location of genes controlling short-term and long-term somatic embryogenesis in wheat revealed by immature embryo culture of aneuploid lines. *Theoretical and Applied Genetics* 89:344-350. doi: 10.1007/bf00225165.

Jain SM (2006) An update on overall recent progress on somatic embryogenesis in forest trees. In: Suzuki K, Ishii K, Sakurai S, Sasaki S (eds) *Plantation technology in tropical forest science*. Springer, Tokyo, pp 113-122.

Karami O, Deljou A, Pour AM (2007) Repetitive somatic embryogenesis in carnation on picloram supplemented media. *Plant Growth Regulation* 51:33-39.doi: 10.1007/s10725-006-9144-0.

Karami O, Aghavaisi B, Pour AM (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Jornal of Chemical Biology* 2:177–190.

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-138.

Karunarathna MN (2008) Isolation and characterization of Arabidopsis mutants with altered response to auxin (Picloram) Dissertation, Texas State University.

Kielly GA, Bowley SR (1992) Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa. *Genome* 35: 474-477.doi: 10.1139/g92-070.

Lelu-Walter M-A, Bernier-Cardou M, Klimaszeska K (2006) Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). *Plant Cell Reports* 25:767-776.doi: 10.1007/s00299-006-0115-8.

MacKay JJ, Becwar MR, Park YS, Corderro JP, Pullman GS (2005) Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding. *Tree Genetics and Genomes* 2: 1-9. doi:10.1007/s11295-005-0020-2.

Merkle SA (1995) Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1:112-121.

Moltrasio R, Robredo CG, Gomez MC, Paleo AHD, Diaz DG, Rios RD, Franzone PM (2004) Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77:119-124.doi: 10.1023/B:TICU.0000016813.94341.7a.

Muralidharan EM, Gupta PK, Mascarenhas, AF (1989) Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Reports* 8:41-43. doi: 10.1007/bf00735775.

Muralidharan M, Mascarenhas A (1995) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: Jain S, Gupta P, Newton R (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 2, Kluwer, Dordrecht, pp 23-40.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473-497. doi:0.1111/j.13993054.1962.tb08052.x.

Nugroro YA, Sumerta Jaya IM, Wiendi NMA, Toruan-Mathius N (2014) Estimation of genetic parameters for in vitro culture traits and selection best progenies for Tenera oil palm tissue culture. *Energy Procedia* 4:316-322. doi: 10.1016/j.egypro.2014.01.231.

O'Brien TP, McCully ME (1981) *The study of plant structure principles and selected methods*. Termarcaphi Pty Ltd, Melbourne. 357 p.

Park YS, Lelu-Walter MA, Harvengt L, Trontin JF, MacEacheron I, Klimaszewska K, Bonga JM (2006) Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 87-101. doi: 10.1007/s11240-006-9101-7.

Perl A, Saad S, Sahar N, Holland D (1995) Establishment of long term embryogenic cultures of seedless *Vitis vinifera* cultivars - a synergistic effect of auxins and the role of abscisic acid. *Plant Science* 104:193-200. doi: 10.1016/0168-9452(94)04013-7.

Perrin M, Gertz C, Masson JE (2004) High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotypes grown worldwide. *Plant Science* 167: 1343-1349. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.07.009.

Pinto G, Santos C, Neves L, Araújo C (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globules* Labill. *Plant Cell Reports* 21:208-213.doi: 10.1007/s00299-002-0505-5.

Pinto G (2007) *Eucalyptus globulus* plant regeneration via somatic embryogenesis. Dissertation, University of Aveiro.

Pinto G, Park EYS, Neves EL, Araújo EC, Santos EC (2008) Genetic control of somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globules* Labill. *Plant Cell Reports* 27:1093-1101.doi: 10.1007/s00299-008-0532-y.

Prakash MG, Gurumurthi K (2010) Effects of type of explants and age plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100:13-20.doi: 10.1007/s11240-009-9611-1.

Priyono BF, Rigoreau M, Ducos JP, Sumirat U, Mawardi S, Lambot C, Broum P, Petiard V, Wahyudi T, Crouzillar D (2010) Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. *Plant Cell Reports* 29:343-357.doi:10.1007/s00299-010-0825-9.

Pullman GS, Johnson S, Peter G, Cairney J, Xu N (2003) Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Reports* 21:747-758.doi: 10.1007/s00299-003-0586-9.

Resende Jr MFR, Munoz PR, Acosta JJ, Peter GF, Davis JM, Grattapaglia D (2012) Accelerating the domestication of trees using genomic selection: Accuracy of prediction models across ages and environments. *New Phytologist* 193:1099-1099. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03895.x.

Resende MDV (2002) *Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília; Embrapa Florestas, Colombo.

Resende, MDV (2004) Métodos estatísticos ótimos na análise de experimentos de campo. Embrapa Florestas, Colombo.

Santos LF (2012) Avaliação da diversidade genética em *Eucalyptus* ssp. por meio de marcadores moleculares e métodos quantitativos. Dissertation, State University of Santa Cruz..

Santos GA, Resende MDV, Silva LD, Higa A, Assis TF (2013). Adaptabilidade de híbridos multiespécies de *Eucalyptus* ao Estado do Rio Grande do Sul. *Revista Árvore* 37:759-769. doi: 10.1590/S0100-67622013000400019.

Sartoretto LM, Barreto CLP, Brasileiro ACM (2008) Biolistic transformation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* callus. *Functional Plant Biology* 29:917-924. doi: 10.1071/PP01153.

Silva JM (2010) Avaliação da variabilidade genética em uma população base de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. para fins de conservação e melhoramento genético. Dissertation, State University Paulista.

Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A (2015) *Plant Physiology and Development*. Sixth edition, Sinauer Associates: Massachusetts.

Takamori LM, Neto NBM, Vieira LGE, Ribas AF (2015) Optimization of somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration of *Urochloa* species using picloram. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 51:554–563. doi: 10.1007/s11627-015-9701-1.

Termignoni RR, Wang P-J, Hu C-Y (1996) Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45:129-132. doi: 10.1007/bf00048755.

Titon M, Xavier A, Otoni WC, Motoyke SY (2007) Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore* 31:417-426. doi:10.1590/S0100-67622007000300007.

Tyankova, ND, Zagorska NA (2001) Genetic control of in vitro response in wheat (*Triticuma estivum* L.). In *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 37:524-530.doi: 10.1007/s11627-001-0091-1.

Watt MP, Blakeway FC, Termignoni R, Jain SM (1999) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii*. In: Jain SM, Gupta PK, Newton, RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 5, Kluwer, Dordrecht, pp 63-78.

Xavier A, Wendling I, Silva RL (2013) *Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas*, 2 ed. Editora UFV, Viçosa.

CONCLUSÃO GERAL

Diante dos objetivos propostos e nas condições em que foram realizados os experimentos do presente estudo, foi possível chegar às conclusões a seguir.

- 1) A indução de pró-embriões somáticos de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* pode ser obtida utilizando sementes ou cotilédones como fonte de explantes, e dicamba e picloram como reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura. Porém, para a obtenção de médias mais altas no percentual de indução de pró-embriões somáticos deve-se utilizar picloram e cotilédones como fontes de explantes. Para a proliferação de pró-embriões somáticos secundários pode-se utilizar meio de cultura líquido adicionado de picloram.
- 2) O meio de cultura JADS proporcionou maior calogênese em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, quando comparado ao meio de cultura MS. A adição de 28,36 μM de putrescina ao meio de cultura proporcionou maior percentual de indução de embriogênese somática nesses mesmos explantes. O número de pró-embriões somáticos formados por explante foi superior quando se acrescentou BAP e principalmente putrescina ao meio de cultura se comparado com o meio contendo somente picloram. Acréscimos na concentração de cálcio nos meios MS e JADS não proporcionam melhorias no que se refere à indução de embriogênese somática nos explantes em estudo.
- 3) Tratamentos com pulso da auxina picloram (207,02 μM) de dois dias pode ser utilizado como fonte de estresse inicial para aquisição da competência embriogênica em explantes cotiledonares e *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. A indução média de calos embriogênicos foi superior no intervalo de dois dias de pulso de auxina, em relação aos outros dois intervalos testados tanto aos 30 dias, como aos 37 e 44 dias de avaliação. A oxidação dos explantes desse estudo, quando colocados em meio de indução, pode ser considerada um indício de formação de calos embriogênicos. A presença de pectinas em regiões periféricas de pró-embriões somáticos pode ser visto como marcador de embriogênese somática em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

- 4) A característica porcentual de pró-embriões somáticos apresenta controle genético, permitindo seleção dos genótipos mais responsivos à clonagem via embriogênese somática de *Eucalyptus*. A correlação genética alta e positiva entre calogênese em média intensidade e indução de pró-embriões somáticos indica que a seleção para a primeira característica deve levar a consistentes respostas na segunda. Os híbridos triplos utilizados no presente estudo apresentaram maiores valores genéticos, quando comparados aos demais híbridos estudados, indicando maior facilidade na indução de embriogênese somática para essa espécie.