



TÂNIA REGINA BATISTA

**ORGANOGENESE E EMBRIOGENESE
SOMÁTICA DE HÍBRIDO DE *Eucalyptus grandis*
x *Eucalyptus urophylla***

**LAVRAS - MG
2012**

TÂNIA REGINA BATISTA

**ORGANOGÊNESE E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE HÍBRIDO DE
Eucalyptus grandis x *Eucalyptus urophylla***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Coorientadores

Prof. Dra. Vanessa Cristina Stein

Prof. Dr. Breno Régis Santos

**LAVRAS – MG
2012**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Batista, Tânia Regina.

Organogênese e embriogênese somática de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* / Tânia Regina Batista. – Lavras : UFLA, 2012.

68 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Eucalipto. 2. Micropropagação. 3. Cultivo de meristema *in vitro*. 4. Cultura de tecido. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.4204162

TÂNIA REGINA BATISTA

**ORGANOGENESE E EMBRIOGENESE SOMÁTICA DE HÍBRIDO DE
Eucalyptus grandis x *Eucalyptus urophylla***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 10 de fevereiro de 2012.

Dr. Breno Régis Santos

UNIFAL

Dr. Vanessa Cristina Stein

UFG

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

**LAVRAS – MG
2012**

A meus pais, por serem meu exemplo de vida e me apoiarem sempre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sempre em todos os momentos desta caminhada procurei o seu auxílio.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal pela oportunidade.

À Capes pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Luciano Vilela Paiva, pela confiança e por acreditar em meu trabalho. Aprendi muito com sua experiência e profissionalismo.

Ao meu coorientador Breno, por ter acreditado em meu potencial desde o início e ser um exemplo de vida para mim. Obrigada por tudo sempre!

Ao grupo eucalipto, especialmente à Evânia, à Flávia, à Vanessa e ao Guilherme por todos os momentos de trabalho e/ou descontração que compartilhamos. Vocês são muito importantes para mim!

Aos amigos da Fisiologia Vegetal, por todos os momentos compartilhados!

Aos amigos do Laboratório Central de Biologia Molecular, em especial Marlúcia, Gustavo, Fabrício, Heliete e Douglas.

À Kamila por todo companheirismo e amizade!!!

À Marinês, pois sem você por perto essa caminhada não teria a mesma graça. Obrigada por sua amizade e carinho constantes!!!

A minha mãe, Valéria, ao meu pai, Marco e meus irmãos Thaís e Marco Túlio, por sempre acreditarem e confiarem em mim. Amo vocês!!!!

Ao meu namorado Cleber, por compreender minhas ausências e por estar sempre ao meu lado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Tendo em vista a crescente demanda por produtos derivados de florestas plantadas, um método que acelere a produção de mudas de eucalipto, em espaço reduzido e com produtividade alta se torna interessante. Neste cenário, a micropropagação *in vitro* aparece como uma alternativa viável sendo que técnicas como a organogênese e a embriogênese somática figuram entre as mais promissoras. Estas se tornam importantes quando aliadas à transformação genética de plantas, na busca da produção de genótipos mais produtivos, atendendo, desta maneira, a demanda por produtos de florestas plantadas. Assim, o desenvolvimento deste trabalho teve por objetivo o estabelecimento de protocolos de regeneração em larga escala de um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* a partir de explantes de tecidos maduros *ex vitro* e estabelecidos *in vitro*. Para o trabalho de organogênese, folhas e meristemas foram inoculados em meios de indução de calos e permaneceram no escuro por 30 dias. Após este período os calos foram transferidos para meios de regeneração e mantidos em sala de crescimento. A avaliação da presença de calos, presença de plantas e área do calo coberta por plantas foi realizada por meio de atribuição de notas por três avaliadores. Como melhores resultados, temos que para a organogênese de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* a utilização de 0,001862 mg.L⁻¹ ANA e 0,1101 mg.L⁻¹ TDZ ou de apenas acrescido de água de coco, seguindo de 0,12754 mg.L⁻¹ de ANA e 0,249972 mg.L⁻¹ de BAP. Para a etapa de embriogênese, meristemas foram retirados de matrizes mantidas em viveiro, e inoculados em meio MS na ausência e suplementados com distintas concentrações de dicamba. Após avaliação realizada aos 90 dias, o melhor resultado alcançado foi com a utilização de 0,25 mg.L⁻¹ de dicamba para a formação de embriões de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

Palavras chave: Eucalipto. Organogênese. Embriogênese. Micropropagação.

ABSTRACT

With a view to increasing of demand for products derived from plantation forests, a method to accelerate the production of seedlings of eucalyptus in a small space and with high productivity becomes interesting. In this scenario, the *in vitro* micropropagation appears as a viable alternative and techniques such as organogenesis and somatic embryogenesis are among the most promising. These, become important when combined with the genetic transformation of plants, looking for the production of more productive genotypes, having thus the demand for products of planted forests. Thus, the development of this work was focused on the establishment of protocols for the somatic embriogenesis, organogenesis and regeneration of a commercial hybrid of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* from explants derivatives from mature tissues *in vivo* and *in vitro* established. For the work of organogenesis, leaves and meristems were inoculated in a medium of induction and remained in the dark for 30 days. After this period, the calli were transfered to the regeneration media and maintained in a grow room. The evaluation of the presence of callus, regeneration of plants and area of the callus covered by plants was performed by score by three examiners. As best results, we have for the organogenesis for *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* were the using of 0,009 μM NAA and 0,5 μM TDZ in absence of the coconut water, followed by 0,71 μM NAA and 1,1 μM BAP. For the stage of embryogenesis, meristems were removed of the matrix maintained in the nursery and inoculated on MS medium supplemented with the absence and different concentrations of dicamba. After evaluation at 90 days, the best result was achieved with the use of 0.25 mg.L^{-1} of dicamba to the formation of embryos of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

Keywords: Eucalyptus. Organogenesis. Embriogenesis. Micropropagation.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO GERAL 11
2	REFERENCIAL TEÓRICO 13
2.1	<i>Eucalyptus</i> 13
2.2	Micropropagação 15
2.3	Organogênese 17
2.4	Embriogênese somática 19
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS 22
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 23
	SEGUNDA PARTE ARTIGOS 29
	ARTIGO 1 ORGANOGÊNESE INDIRETA A PARTIR DE
	EXPLANTES MADUROS DE <i>Eucalyptus grandis</i> X <i>Eucalyptus</i>
	<i>urophylla</i>..... 30
	RESUMO 31
	ABSTRACT 32
1	INTRODUÇÃO 33
2	MATERIAL E MÉTODOS..... 34
2.1	Local dos experimentos 34
2.2	Material vegetal..... 34
2.3	Indução de calos e regeneração..... 34
2.4	Enraizamento e aclimatização 36
2.5	Acompanhamento de crescimento e análises histológicas dos calos 36
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
4	CONCLUSÃO 48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 49
	ARTIGO 2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM EXPLANTES
	FOLIARES E MERISTEMÁTICOS DE <i>Eucalyptus grandis</i> X
	<i>Eucalyptus urophylla</i> 52
	RESUMO 53
	ABSTRACT 54
1	INTRODUÇÃO 55
2	MATERIAL E METODOS..... 57
2.1	Local dos experimentos 57
2.2	Material vegetal..... 57
2.3	Embriogênese 57
2.4	Análises ultraestruturais 58
2.5	Análises histológicas..... 59

3	RESULTADO E DISCUSSÃO	60
4	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

PRIMEIRA PARTE

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

Eucaliptos são árvores folhosas de rápido crescimento com média de 45 m³.ha⁻¹.ano⁻¹ em plantios clonais. Existem espécies cujas árvores registram alturas superiores a 100 metros, as quais produzem fibras e polpa de madeira de alta qualidade, com baixo custo e em curto espaço de tempo, com ciclos de até 21 anos (HO et al.,1998). A utilização econômica do eucalipto está diretamente relacionada às condições climáticas da localização geográfica em que pode ocorrer. Estes são ricos em óleos essenciais que são amplamente utilizadas nas indústrias farmacêuticas e perfumarias. Algumas espécies são utilizadas como ornamentais, quebra ventos, combustível para locomotivas, polpa para produção de papel, carvão e postes (TURNBULL, 1999). Essas características de versatilidade de uso tornam o eucalipto uma espécie tropical de grande importância econômica em âmbito mundial (SARTORETTO et al., 2002).

As indústrias brasileiras que utilizam o eucalipto como matéria-prima para a produção de papel, celulose e demais derivados representam 5% do Produto Interno Bruto, com cifras em torno de US\$3 bilhões em impostos e US\$16 bilhões em exportações (segundo maior em superávit comercial) e emprega mais de 2 milhões de pessoas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2010).

Com base nas expectativas de crescimento da demanda, haverá necessidade significativa de aumento de plantio e produtividade. Porém, por razões ambientais e empresariais, é valoroso que o aumento da produção seja dado mais em função do aumento na produtividade em campo (além do industrial) do que no aumento de área. Desta forma, a biotecnologia pode ser utilizada para obtenção de ganhos em produtividade e sustentabilidade (GOLLE et al, 2009). Assim, técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos aliada à transformação genética, unem-se ao melhoramento convencional, permitindo a

obtenção de genótipos mais produtivos (SARTORETTO et al., 2008) atendendo a demanda por produtos de qualidade com baixo custo de produção.

O cultivo *in vitro* de eucalipto apresenta-se como um método eficaz na propagação clonal de espécies florestais, principalmente quando se leva em conta a utilização de genótipos elite nos programas de melhoramento genético. Dentre as técnicas de micropropagação destacam-se a organogênese e a embriogênese, que utilizadas com o intuito de regenerar plantas transformadas geneticamente, tornam-se cruciais para o processo.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de protocolos eficientes de organogênese e embriogênese de um híbrido *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis*. Entre outras características vantajosas, este híbrido possui uma densidade de madeira de 0,498 g.cm³ e incremento de madeira anual de 50 m³.ha⁻¹. Portanto, considerado um híbrido de alto interesse comercial.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* L'Hér é um membro da família Myrtaceae e é composto por mais de 700 espécies (BROOKER, 2000). Apesar de ser uma espécie nativa da Austrália, existem espécies adaptadas a diferentes condições ambientais.

Uma interessante variação genética intraespecífica e sua ampla adaptabilidade fizeram do eucalipto uma árvore ideal para plantio em diferentes regiões do mundo (ELDRIDGE et al, 1993). Devido a isto, plantações extensivas estão crescendo, em continentes como Ásia, América do Sul, Europa e África (TURNBULL, 1999). Entre as espécies mais utilizadas nestes plantios estão *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus camaldulensis* além de seus híbridos que compreendem 80% da área plantada mundial de espécies do gênero (POTTS; DUNGEY, 2004).

Entre os aspectos mais relevantes para a expansão no plantio estão o rápido crescimento em ciclo de curta rotação, a alta produtividade florestal e o direcionamento de novos investimentos por parte de empresas que utilizam sua madeira como matéria prima em processos industriais. Em destaque, as expansões previstas no segmento de celulose e papel têm sido a alavanca do crescimento nas áreas plantadas deste grupo de espécies (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2010).

Segundo Dossa et al. (2002), a produtividade do eucalipto pode ser considerada como um dos principais fatores que determinam sua expansão no mercado de papel, carvão, celulose e, serraria. Atualmente, existem plantios de

eucalipto melhor adaptados que atingem rendimentos de aproximadamente $60\text{m}^3.\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$.

No Brasil a atividade florestal tem significativa importância econômica e social, disponibilizando uma ampla gama de produtos comerciais. Sua madeira é utilizada para a construção, a biomassa para a produção de polpa de celulose e papel, e na indústria siderúrgica o carvão vegetal é o mais importante combustível e redutor do minério de ferro (SARTORETTO et al., 2008). Em se tratando de produtos de florestas plantadas, o Brasil figura como o maior exportador mundial de celulose e fibra de eucalipto. A grande versatilidade genética faz com que o eucalipto apresente características físico-mecânicas que permitam inúmeras utilizações como matéria-prima.

No estado de Minas Gerais, as espécies são mais utilizadas para a produção de carvão vegetal que atende as demandas das siderúrgicas brasileiras, sendo que uma mínima parte é exportada. As características das espécies como densidade de madeira considerável garantem um carvão facilmente renovável e de boa qualidade (SANTOS, 2008). A Associação Mineira de Silvicultura destaca que, em 2009, no Brasil foram produzidos 40% do total de carvão vegetal consumido no mundo, o qual se destinou à produção de ferro gusa, aço, ferro ligas, e silício metálico. O estado de Minas Gerais figura como maior produtor e consumidor possuindo o maior parque siderúrgico movido a carvão vegetal do mundo, o que contribui de forma direta para a participação do setor florestal com 7% do PIB nacional (ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE SILVICULTURA - AMS, 2010).

Além de sua importância econômica, o eucalipto tem um importante papel na preservação das florestas nativas, que até então, eram as únicas fontes de abastecimento para a indústria. As florestas de eucalipto contribuem na geração de riquezas e empregos para as comunidades mais afastadas dos centros

populacionais, o que as torna positivamente impactante sobre o meio antrópico (GONZÁLEZ, 2002), no sentido da geração de renda.

2.2 Micropropagação

Atualmente, dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, destaca-se a micropropagação como a de maior interesse científico. Na área florestal enfatizam-se os esforços no intuito de tornar esta tecnologia acessível e economicamente viável. Porém, dificuldades são encontradas durante o processo como: a necessidade de desenvolvimento de protocolos otimizados para diferentes espécies ou grupos de clones e a recalcitrância das culturas na propagação *in vitro* de espécies lenhosas.

Apesar dos avanços biotecnológicos relativos à propagação *in vitro* serem pouco expressivos se comparados com outras culturas de expressão agrícola, é reconhecido o grande potencial de impacto da utilização desta biotecnologia na silvicultura clonal e na indústria de base florestal (PENCHEL et al., 2007, XAVIER et al., 2009).

Os resultados efetivos obtidos com a propagação contínua de espécies do gênero *Eucalyptus* são poucos. Deste modo, o uso da micropropagação na produção comercial de mudas ainda não se justifica economicamente, embora tenha se mostrado tecnicamente viável na clonagem de espécies recalcitrantes (ASSIS; MAFIA, 2007), sendo indicada apenas para o rejuvenescimento de clones selecionados de espécies e híbridos de alto valor comercial (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Além do uso nos programas de melhoramento genético, representando uma redução no tempo de obtenção de novas cultivares modificadas geneticamente.

Assim, os estádios de desenvolvimento da propagação *in vitro* são constituídos de fases que incluem a seleção do explante e obtenção de culturas

livres de contaminantes, a multiplicação dos propágulos vegetativos, o enraizamento e a aclimatização na condição *ex vitro* das plantas obtidas *in vitro* (XAVIER, 2009). São reconhecidos vários processos para a obtenção de plantas *in vitro* em larga escala sendo que dentre estes, destacam-se a organogênese e a embriogênese somática. Estes processos são também importantes nos programas de transformação genética, no sentido regenerar plantas a partir de tecidos transformados geneticamente uma vez que quanto mais eficiente, maior a possibilidade de se ter sucesso.

O processo de micropropagação via organogênese *in vitro* é considerado complexo, com a atuação de múltiplos fatores externos e internos, envolvendo interação entre a fonte de explante, o meio de cultura e fatores do ambiente (XAVIER, 2009). Depende, ainda, da ação de reguladores de crescimento, em particular auxinas e citocininas, como também da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo. Apesar dos estudos em relação a esta técnica terem avançado muito nos últimos anos, ainda se faz necessário a adequação de protocolos de regeneração visando torná-la aplicável para os programas de silvicultura clonal de *Eucalyptus* (ALVES; XAVIER; OTONI, 2004; XAVIER et al., 2007).

Outra técnica que se destaca na propagação em massa de espécies é a embriogênese somática apresentando vantagens como a obtenção de grande quantidade de propágulos (embriões somáticos), permitindo um elevado grau de automação e redução dos custos por unidade produzida. Entre as várias aplicações da embriogênese somática *in vitro* na área florestal destaca-se a embriogênese repetitiva, em que teoricamente, uma cultura iniciada de um único explante pode produzir um número ilimitado de embriões, tornando o processo altamente atrativo para a produção massiva de plantas. Aliado a isso, tem-se a possibilidade de produção de sementes sintéticas pelo encapsulamento dos

embriões somáticos, com um mínimo de manipulação e espaço físico de laboratório (XAVIER, 2009).

A micropropagação, portanto permite a redução de tempo na obtenção de genótipos de *Eucalyptus* transformados geneticamente e pode ser economicamente viável na multiplicação desde que se obtenha protocolos eficientes neste sentido.

2.3 Organogênese

A organogênese geralmente se dá pela otimização da relação citocinina/auxina no meio de cultura e ocorre pela diferenciação de órgãos e brotos diretamente do explante (organogênese direta) ou do calo (organogênese indireta) podendo originar-se de uma única célula ou de um conjunto de células. A organogênese caracteriza-se por ser uma estrutura monopolar e apresenta ampla conexão vascular dos órgãos formados com o explante (ANDRADE, 2005). Segundo Brandão et al (2005), a partir das células do calo surgem gemas adventícias capazes de desenvolver novas estruturas (parte aérea ou raiz), as quais podem ser utilizadas para a propagação de várias espécies.

Para Alves, Xavier e Otoni (2004), o processo de organogênese é complexo, com atuação de múltiplos fatores externos e internos, envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura e fatores do ambiente, dependendo também da ação de reguladores de crescimento exógenos, em particular auxinas e citocininas e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais, durante o período de cultivo (SUGIYAMA, 1999).

Muitos fatores, como a idade do explante, a utilização de reguladores de crescimento, antibióticos, e outros têm sido reportados como tendo influencia na regeneração de plantas (MARTIN et al., 2003; SUBBAIAH; MINOCHA 1990; YU; WEI, 2008). Como desvantagem, a organogênese indireta, em que o

explante passa pelo estagio de calo anteriormente à regeneração de plantas, pode gerar variantes somaclonais (PALOMBI; LOMBARDO; CABONI, 2007).

Avanços estão sendo feitos para entender a ação dos reguladores de crescimento, principalmente em nível molecular, como sinalizadores de membranas e suas interações com os genes envolvidos no processo de morfogênese nas plantas. Vários genes já foram identificados, por exemplo, o CRE1 que supostamente é um receptor de citocinina e o CYCD3 envolvido na aquisição de competência para organogênese (PHILLIPS, 2004).

A organogênese é uma técnica chave quando associada à transformação genética, pois possibilita a regeneração de plantas transgênicas após o cocultivo com a bactéria ou depois da submissão ao bombardeamento. No entanto, o desenvolvimento de protocolos eficientes de regeneração é o mais crítico passo para o processo de transformação genética. Protocolos têm sido estabelecidos para muitas espécies de eucaliptos sendo que a maioria destes utiliza como explantes cotilédones, hipocótilos e segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro* (QUORIN; QUINSEN, 2006).

Estudos de regeneração de plantas têm sido reportados para várias espécies de eucaliptos: para *E.camaldulensis* (DIBAX et al., 2005; HO et al., 1998; MULLINS et al., 1997; MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1987; QUISEN, 2007), *E. tereticornis* (PARTHIBAN et al., 1999; SUBBAIAH; MINOCHA, 1990), *E. grandis* (HAJARI et al., 2006; LAINÉ; DAVID, 1994; WARRAG; LESLEY; ROCKWOOD, 1991), *E. urophylla* (TIBOK et al., 1995), *E. globulus* (SERRANO et al., 1996), *E. gunnii* (HERVÉ et al., 2001) e *E. grandis* x *E. urophylla* (ALVES; XAVIER; OTONI, 2004; GONZALES et al., 2002; TOURNIER et al., 2003). Contudo os estudos citados anteriormente apenas descrevem os protocolos de regeneração, não fazem estudos aprofundados no sentido de acompanhamento do processo organogênico. Este processo é de grande importância uma vez que dá subsídios à futuros estudos no

sentido de aprimoramento de técnicas e visualização da integridade do material formado. Embora brotos e raízes possam ser emitidos, pode não ocorrer uma conexão vascular entre eles, o que é de extrema necessidade para a viabilização da plântula (WETMORE & RIER 1963).

2.4 Embriogênese somática

Nas últimas décadas a embriogênese somática foi desenvolvida com o intuito de propiciar uma rápida multiplicação de inúmeras espécies, e, passou a ser utilizada não somente como uma técnica de pesquisa, mas com o interesse industrial (PINTO, et. al. 2011). Atualmente, figura como uma das técnicas de maior interesse na cultura de tecidos vegetais e pode ser entendida como um conjunto de etapas pelas quais células somáticas diferenciam-se em embriões.

O processo que ocorre com o explante, se assemelha morfológicamente ao que ocorre com embriões zigóticos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008), podendo ser empregado para estudos de desenvolvimento embrionário e para propagação vegetativa em larga escala.

Mais especificamente este processo é caracterizado quando células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas. Dois padrões de embriogênese somática podem ser distinguidos *in vitro*. O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos-matrizes, sem a formação de estádios intermediários de calo. O segundo, denominado modelo indireto, ocorre quando os embriões se formam a partir de um calo, que apresenta diferentes estádios de diferenciação (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

A principal vantagem da embriogênese somática é que, ao contrário da organogênese, a regeneração de embriões somáticos pode ocorrer a partir de

células individuais. Além disso, em muitas plantas em que esta técnica foi aplicada, uma embriogênese secundária, um fenômeno em que novos embriões surgem a partir de embriões somáticos, foi muitas vezes observado (MOURA et al, 2001).

Após a formação das células embriogênicas, estas continuam a se proliferar até formar as massas pró-embriogênicas (MPE). A auxina é requerida para a proliferação das MPE, mas também inibe o desenvolvimento delas em embriões somáticos, pois, no meio de cultura, a auxina inicia um rápido processo de degradação. Portanto, para a proliferação das MPE é necessário transferir frequentemente o material para um meio fresco. Do contrário, os embriões podem iniciar seu processo de desenvolvimento (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999), o que não seria interessante para o desenvolvimento de suspensões celulares e para a multiplicação de calos pró-embriogênicos.

A embriogênese somática pode ser obtida em meio líquido por meio da utilização de suspensões celulares. Geralmente estas suspensões celulares podem ser iniciadas pela inoculação de calos friáveis em meio líquido e sob agitação. Esta é uma técnica que permite a indução, propagação e manutenção de células em meio líquido, as quais apresentam taxas de divisão muito mais elevadas do que as cultivadas de maneira convencional (GUERRA et al., 1999; GEORGE et al., 2008). As suspensões celulares podem ser utilizadas para diversos fins como: transformação genética, fusão de protoplastos, mutagênese, criopreservação, micropropagação e indução de variação somaclonal (MATSUMOTO, 2006; PANIS; SWENNEN; ENGELMANN, 2004). A transformação de células em suspensão é vantajosa uma vez que as plantas são regeneradas a partir de uma célula, evitando a formação de quimeras.

Dentre as principais aplicações da embriogênese somática na área florestal, está o uso de embriões somáticos na propagação em massa de

Eucalyptus, especialmente para aquelas espécies ou clones de difícil enraizamento, pois esta etapa não é necessária durante o processo (BAJAJ, 1995). Embora o *Eucalyptus* apresente altas taxas de multiplicação por gemas axilares, estudos realizados indicam o potencial de obtenção de taxas muito maiores com a embriogênese somática. A técnica apresenta também vantagens adicionais como: redução no número de estádios de cultura, redução de trabalho e custo, rapidez e facilidade para a produção em larga escala em meio líquido utilizando biorreatores (HAINES, 1994; WATT et al., 1999), bem como a possibilidade de encapsulamento e armazenamento de embriões como sementes sintéticas (BAJAJ, 1995).

Uma melhor compreensão dos fatores que controlam a embriogênese somática auxiliará no aumento da eficiência de protocolos. É sabido que, em geral, o desenvolvimento *in vitro* de células e tecidos depende da interação combinada de fatores internos (genótipo, idade, tipo de explante, condições fisiológicas) e fatores externos (composição do meio de cultura, reguladores de crescimento, luz, temperatura e presença de compostos antioxidantes) (PINTO, et. al. 2008).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Atualmente, considerando que o mercado da eucaliptocultura está em franca expansão, há a necessidade por parte de empresas de base florestal de aumentar seus rendimentos de maneira eficiente. Assim, à obtenção de plantas que possuam uma rentabilidade alta aliada à rapidez de propagação passa a ser de grande interesse.

Neste cenário as técnicas de micropropagação ganham destaque e aparecem como alternativa promissora. Pois, por meio destas, há a possibilidade de propagação clonal em larga escala obtendo-se plantas com qualidade fitossanitária e manutenção de características genéticas de interesse. Dentre as técnicas que podem ser empregadas neste sentido, destacam-se a embriogênese somática e a organogênese.

A obtenção de um protocolo específico de embriogênese somática e de organogênese para o híbrido obtido entre as espécies *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e a compreensão histológica do processo são conhecimentos importantes para a comunidade científica e para as empresas do setor florestal. A partir destas informações, há a possibilidade de se realizar o processo de transformação genética da espécie, inserindo características únicas de interesse aumentando assim a qualidade do clone alvo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMANN, L. et al. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. **Annals Botany**, London, v. 92, p. 613–623, 2003.

ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *eucalyptus grandis* x *e. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.

ANDRADE, W. F. **Efeito do “pulse” na organogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro***. 2005. 55 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

ASSIS, T. F. MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: [s. n], 2007. p. 93-121.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico**: ano base 2009. Brasília, 2010. 15 p. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatísticas>>. Acesso em: 9 nov. 2011.

ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE SILVICULTURA. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.silviminas.com.br>>. Acesso em: 16 dez. 2012.

BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). Somatic embryogenesis and synthetic seed I. **Biotechnology in agriculture and forestry**. New York: Springer-Verlag, 1995.v. 30, 472 p.

BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L’Her. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, Melbourne, v. 13, p. 79–148, 2000.

DIBAX, R. et al. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 62, p. 406-412, 2005 .

DOSSA, D. et al. **Produção e rentabilidade do eucalipto em empresas florestais**. Colombo: EMBRAPA, 2002. 4 p.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p.49-59, jan./jun. 2009

ELDRIDGE, K. et al. ***Eucalyptus* domestication and breeding**. New York: Oxford University, 1994. 228 p.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: The Backgroups, 2008. v. 1.

GOLLE, D. P. et al. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1606-1613, ago. 2009.

GONZÁLEZ, E. R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium***. 2002. 93 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz", Piracicaba, 2002.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, 1999. v. 2, p. 533-568.

HAINES, R. J. Mass propagation by cuttings, biotechnologies and the capture of genetic gain. In: MASS PRODUCTION TECHNOLOGY FOR GENETICALLY IMPROVED FAST GROWING FOREST TREE SPECIES, 1., 1994, Bordeaux. **Proceedings...** Paris: AFOCEL/ IUFRO, 1994. p.137-150.

HAJARI, E. et al. Plant regeneration from induced callus of improved Eucalyptus clones. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 72, p. 195-201, 2006.

HERVÉ, P. et al. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Limerick, v. 161, p. 645-653, 2001.

HO, C. K. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, p. 675-680, 1998.

LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 473-476, 1994.

MARTIN, K. P. et al. Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* hort. **In vitro Cell Development Biology Plant**, Raleigh, v. 39, p. 500-504, 2003.

MATSUMOTO, K. **Cultura de células em suspensão**: focalizando a bananeira. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 126.

MOURA, T. L. et al. Organogênese *in vitro* de citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 240-245, 2001.

MULLINS, K. V. et al. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 787-791, 1997.

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

PALOMBI, M. A.; LOMBARDO, B.; CABONI, E. *In vitro* regeneration of wild pear (*Pyrus pyraeaster* Burgsd) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 26, p. 489–496, 2007.

PANIS, B.; SWENNEN, R.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant germplasm. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 560, p. 79-86, 2004.

PARTHIBAN, K. T. et al. Callogenesis and organogenesis in *Eucalyptus tereticornis*. **Journal of Forestry**, Washington, v. 22, p. 101-105, 1999.

PHILLIPS, G. C. *In vitro* morphogenesis in plants: recent advances. **In vitro cellular and developmental Biology Plant**, Gaithersburg, v. 40, p. 342-345, 2004

PINTO, G. et al. Acclimatization of secondary somatic embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill.: an ultrastructural approach. **Trees**, Santa Monica, v. 25, p. 383–392, 2011.

PINTO, G. et al. Genetic control of somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 1093–1101, 2008.

POTTS, B. M.; DUNGEY, H. S. Interspecific hybridization of eucalypts: key issues for breeders and geneticists. **New Forestry**, Columbia, v. 27, p. 115–138, 2004.

QUISEN, R. Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*. 2007. 131 p. PhD (Thesis Agronomical Sciences) - Federal University of Paraná, Curitiba, 2007.

QUORIN, M.; QUINSEN, R. Advantages in genetic transformation os *Eucalyptus species*. **Molecular Biology of tropical Plants**, Trivandrum, v. 1, p. 1-57, 2006.

SANTOS, I. D. **Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica, contração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal de cinco Florestal espécies lenhosas do cerrado**. 2008. 57 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SARTORETTO, L. M.; BARRUETO, C. L. P.; BRASILEIRO, A. C. M. Biolistic transformation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* callus. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 29, n. 8, p. 917-924, 2002.

SARTORETTO, L. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

SERRANO, L. et al. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistic: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. **Journal Experimental Botany**, Kettering, v. 47, p. 285-290, 1996.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. **Atualidades**. 2008. Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/atualidades.php>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

SUBBAIAH, M. M.; MINOCHA, S. C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, p. 370-373, 1990.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, p. 61-64, 1999.

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

TOURNIER, V. et al. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Reports**, London, v. 12, n. 4, p. 403-411, 2003. Disponível em: Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1024217910354>>. Acesso em: 22 dez. 2011.

TURNBULL, J. W. Eucalypt plantations. **New Forestry**, Columbia, v. 17, n. 1/3, p. 37-52, 1999.

WARRAG, E.; LESLEY, M. S.; ROCKWOOD, D. J. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, p. 586-589, 1991.

WATT, M. P. et al. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii*. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Kluwer: [s. n.], 1999. v. 5, p. 63-78.

YU, Y.; WEI, Z. M. Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. **Biology Plantarum**, Heidelberg, v. 52, p. 553-556, 2008.

SEGUNDA PARTE

Artigos

ARTIGO 1

**Organogênese indireta a partir de explantes maduros de
Eucalyptus grandis x *Eucalyptus urophylla***

RESUMO

A organogênese somática é uma das técnicas em maior destaque dentro da cultura de tecidos de plantas principalmente quando aliada à transformação genética em busca da produção de genótipos mais produtivos. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo eficiente de organogênese a partir de explantes maduros de plantas de *E. grandis* x *E. urophylla* estabelecidas *in vitro*. Para isto folhas e ápices meristemáticos foram extraídos e inoculados em meio MS, com modificações, suplementado ou não com água de coco, e submetidos a diferentes concentrações dos reguladores de crescimento ANA e TDZ. Após 30 dias os explantes foram transferidos para meios de regeneração MS, com modificações, com a suplementação de ANA e BAP acrescido ou não de água de coco. Foram realizadas avaliações quanto à presença de calos, presença de plantas e da área do calo coberta por plantas. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (14x2). O melhor tratamento obtido foi utilizado para a realização de uma curva de acompanhamento de desenvolvimento dos calos por meio de pesagem e histologia. Os melhores resultados para a obtenção de calos e regeneração de plântulas foram obtidos quando ápices meristemáticos foram submetidos ao meio MS com modificações suplementado com 0,009 µM ANA e 0,5 µM TDZ e o mesmo meio com suplementação de água de coco.

Palavras chave: Eucalipto. Organogênese. Acompanhamento de crescimento. Histologia de calos organogênicos.

ABSTRACT

The somatic organogenesis is one of the techniques in greater prominence within the tissue culture plants especially when combined with the genetic transformation of production in search of more productive genotypes. The objective of this study was to establish an efficient protocol for organogenesis from explants of mature plants of *E. grandis* x *E. urophylla* established *in vitro*. Leaves and shoot tips were extracted and inoculated on MS medium with modifications supplemented or without coconut water, and subjected to different concentrations of growth regulators NAA and TDZ. After 30 days the explants were transferred to regeneration on MS media with modifications with the addition of NAA and BAP added or not coconut water. The evaluated for the presence of calluses, small plants and the area covered by plant callus. The design was completely randomized factorial (14x2). We chose the best treatments obtained for the realization of the curve tracking callus development by weight and histology. The best results for obtaining callus and regeneration of plantlets were obtained when shoot tips were subjected to a modified MS medium supplemented with 0,009 μM NAA and 0,5 μM TDZ and the same medium supplemented with coconut water.

Key words: Eucalyptus. Organogenesis. Monitoring of growth. Organogenic callus histology.

1 INTRODUÇÃO

A utilização das espécies do gênero *Eucalyptus* como insumo na indústria de produtos como papel, celulose, madeira serrada, compensados, postes, dentre outros, faz com que este tenha grande importância econômica. Sua crescente demanda tem como consequência a necessidade significativa de incremento de plantio e produtividade dessa espécie.

No entanto, por razões ambientais e empresariais, é valoroso que o aumento da produção seja dado mais em função do aumento na produtividade em campo do que no aumento de área. Para isto técnicas de manipulação genética das espécies têm sido amplamente utilizadas. Contudo, a aplicação de métodos convencionais para o melhoramento genético de espécies florestais, embora eficiente, é relativamente demorado, pois muito tempo é gasto para completar cada geração de cruzamento e para obter novas progênies (DIBAX, 2010).

Desta forma, a biotecnologia pode ser utilizada para obtenção de ganhos em produtividade e sustentabilidade (GOLLE et al, 2009). Técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos aliada à transformação genética, unem-se ao melhoramento convencional, permitindo a obtenção de genótipos mais produtivos (SARTORETTO et al., 2008) atendendo a demanda por produtos de qualidade com baixo custo de produção. Assim, o estabelecimento e entendimento do processo de regeneração via organogênese *in vitro* se torna essencial para o sucesso deste procedimento.

Obter um protocolo eficiente de organogênese e regeneração *in vitro* de explantes foliares e/ou meristemáticos de um híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e acompanhar a eficiência do processo por análise histológica e pela pesagem sequencial do material obtido foram os objetivos deste trabalho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Central de Biologia Molecular, localizado no campus da Universidade Federal de Lavras.

2.2 Material vegetal

O material vegetal utilizado neste trabalho foi obtido de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* cultivados em viveiro comercial e introduzidos no cultivo *in vitro* por meio da cultura de meristemas.

2.3 Indução de calos e regeneração

Os ápices meristemáticos e as folhas das plântulas estabelecidas *in vitro* foram utilizados como explantes. O experimento foi composto por duas fases, uma referente à indução de calos e outra referente à regeneração dos mesmos.

Para a indução de calos, os explantes foram inoculados em frascos contendo 50 mL de meio de cultura MS com modificações com a suplementação ou não de água de coco (Kero-coco®) além de distintas combinações das concentrações dos reguladores de crescimento ANA - Ácido Naftaleno Acético - (0,009; 0,09 μ M) e TDZ -Thidiazuron - (0,5; 1,0; 1,5 μ M) e na ausência destes. Os frascos foram mantidos no escuro por um período de 30 dias, sendo que os explantes foram transferidos para um novo meio de cultura após um intervalo de 15 dias.

Após os 30 dias da inoculação os calos obtidos foram transferidos para meios de regeneração MS com modificações acrescido de diferentes combinações dos reguladores de crescimento ANA e 6-benzilaminopurina (BAP). No primeiro tratamento utilizou-se a combinação de 0,68 μM de ANA e 1,1 μM de BAP e no segundo 0,04 μM de ANA e 2,46 μM de BAP acrescido de 100ml por litro de água de coco (Kero-coco®). Os frascos foram então transferidos para um fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 26 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$. Após 15 dias, o material foi transferido para um novo meio.

Todos os meios de cultura foram acrescidos de 30 g.L^{-1} de sacarose, 4,5 g.L^{-1} de agar e autoclavados à 121 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos.

Após 60 dias de inoculação foram avaliadas as características: presença de calos, área do calo coberta por plantas e presença de plantas. A avaliação foi realizada por três avaliadores e nesta foram dadas notas referentes às seguintes características.

- Para calos: nota 1 para a presença e 2 para a ausência.
- Para área do calo coberta por plântulas: nota 1 (0%), 2 (25%), 3 (50%), 4 (75%) e 5 (100%).
- Para presença de plântulas: nota 1 (presença) e 2 (ausência).

O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (14:2), consistindo de 14 tratamentos de indução X 2 tratamentos de regeneração, 4 repetições e 7 parcelas.

A análise estatística foi realizada por meio de ANAVA seguida da comparação de porcentagem de formação de calos e de plântulas e média das notas pelo teste de Skott-Knott à 5% de significância.

2.4 Enraizamento e aclimatização

Plântulas selecionadas nos melhores tratamentos foram enraizadas *in vitro* com a utilização de meio de cultura de enraizamento suplementado com ácido indol-acético (AIA). Após o período de 30 dias estas foram transplantadas para tubos de polietileno de 56 cm³, contendo substrato e transferidos para câmara de nebulização com 90% de umidade relativa do ar, temperatura média de 31°C, sistema de nebulização automático a cada 5 minutos, fotoperíodo de 12 horas e intensidade de luz 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.5 Acompanhamento de crescimento e análises histológicas dos calos

Após o estabelecimento do melhor tratamento para a obtenção de calos organogênicos realizou-se o acompanhamento do crescimento de novos calos por meio da pesagem e histologia. Para tal, ápices meristemáticos foram novamente inoculados em meio MS, com modificações, acrescido das mesmas concentrações de ANA e TDZ do melhor tratamento. Os frascos foram mantidos no escuro por 30 dias os explantes foram transferidos para um novo meio de cultura após um intervalo de 15 dias. Transcorridos 30 dias de inoculação os calos foram transferidos para meio MS, com modificações, acrescido de ANA e BAP. Os frascos foram então colocados em um fotoperíodo de 16 horas a intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 26 \pm 2°C. Após 15 dias nestas condições, os explantes foram transferidos para novos meios de cultura.

As avaliações para fins de obtenção da análise de crescimento foram realizadas a partir do primeiro dia da inoculação (tempo 0), até o 64^o dia, com intervalos entre as pesagens de 7 dias, gerando 9 pontos de análise. Para isto, foram inoculados 50 explantes meristemáticos. Na pesagem, os calos foram

cuidadosamente colocados em placa de Petri estéril, vedada com filme PVC, mantendo-se, assim, a condição asséptica para que eles pudessem retornar posteriormente ao meio de cultura. Os calos foram pesados com auxílio de uma balança de precisão, tendo as análises sido realizadas a partir do peso fresco dos 30 explantes, o restante do material inoculado foi utilizado no acompanhamento histológico.

Os valores obtidos foram submetidos a teste de regressão para a confecção de uma curva representativa do crescimento dos calos. O percentual de crescimento dos calos foi verificado segundo a equação determinada por Lameira et al. (1996):

$$\% \text{ crescimento} = \frac{P_f - P_i}{P_f} \times 100$$

Sendo P_i = peso inicial e P_f = peso final de calos

A taxa de crescimento foi calculada de acordo com Teixeira et al. (2004), pela seguinte fórmula:

$$\text{TCM} = \frac{\ln P_f - \ln P_i}{t}$$

Sendo: TCM = taxa de crescimento médio; ln = logaritmo neperiano; P_f = peso final da matéria fresca; P_i = peso inicial da matéria fresca e t = o período de cultivo, em dias.

O material utilizado para as análises histológicas, foi coletado aleatoriamente no momento da inoculação. Cinco ápices meristemáticos foram coletados e 20 explantes inoculados no meio de indução de calos e regeneração de plantas dos quais cinco foram coletados a cada 15 dias. Este material foi fixado em FAA50 (formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico 50%) por 48 horas, em seguida, conservado em álcool etílico 70%. Em sequência foi desidratado em etanol e emblocado em historesina Leica de acordo com o

protocolo do fabricante com ligeiras modificações. Foram feitos cortes com espessura de 5 μm em micrótomo de rotação, os quais foram corados com azul de toluidina na concentração de 0,1% e visualizados em microscópio óptico Leica na objetiva de 10X.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser visto na figura 1, aos 15 dias da inoculação foi possível observar o começo da formação de calosidades tanto em folhas quanto em ápices meristemáticos (figura 1a). Aos 30 dias, os calos estavam completamente formados, apresentando coloração amarelo escura (figura 1b). Aos 45 dias, observou-se o início da formação de plântulas em calos advindos de ápices meristemáticos (figura 1c), o que não ocorreu para os calos oriundos de folhas. Estes se apresentavam completamente oxidados nesta idade. Aos 60 dias, os calos vindos de ápices meristemáticos já se encontravam com um grande número de plantas regeneradas (figura 1d).

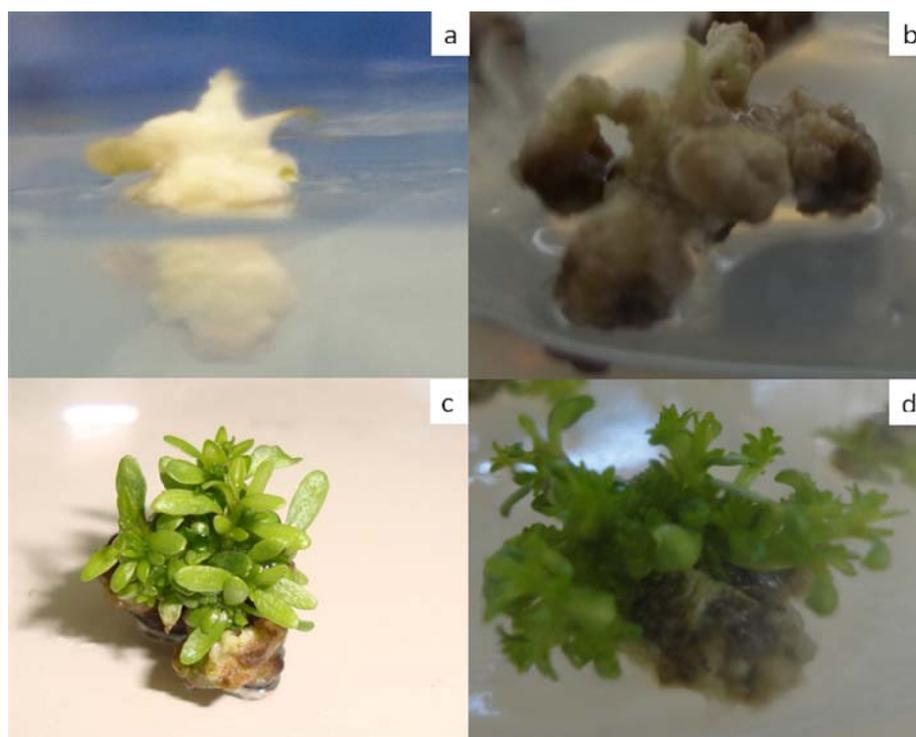


Figura 1: Aspecto visual de da formação de calos e regeneração de plantas a partir de ápices meristemáticos de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. a – após 15 dias de inoculação, b – 30 dias, c - 45 dias, d - 60 dias.

Com base nos resultados estatísticos demonstrados na tabela 1, conclui-se que utilizar ápices meristemáticos como explantes não provoca diferença significativa em todas as características avaliadas para a utilização ou não de água de coco no meio de cultura. A ausência de reguladores de crescimento aliada à suplementação com água de coco, ocasionou uma formação de calos estatisticamente inferior (0,7023), mas a área de regeneração de plântulas manteve-se semelhante aos melhores tratamentos obtidos para esta variável (2,2619). Este fato possivelmente deve-se à presença de zeatina, uma citocinina natural encontrada no endosperma de coco (água de coco), que promove a divisão celular e proporciona a morfogênese *in vitro*. A concentração desta no meio de cultura pode ter sido suficiente para acarretar a formação de calos e regeneração de brotos.

Quanto ao meio de regeneração utilizado, não houve diferença significativa para todas as variáveis analisadas, ou seja, a utilização de água de coco também não promoveu uma significativa regeneração de plântulas e, quaisquer das concentrações dentre as testadas, para ANA e BAP podem ser utilizadas para este fim.

Quando se leva em conta os tratamentos de indução de calogênese, houve diferença significativa para todas as características avaliadas, resultado que demonstra a importância desta etapa no processo organogênico. Em menores concentrações dos reguladores de crescimento ANA e TDZ sem a presença de água de coco, pode-se observar uma maior presença de plântulas (0,72), porém este valor não foi acompanhado por uma maior porcentagem de formação de calos (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados estatísticos de média das notas dadas por 3 avaliadores.

Tratamento	Proporção de formação de calos	Área dos calos coberta por plantas	Proporção de plantas regeneradas
Ausência de reguladores	0,4107 c	1,8154 a	0,6666 a
0,009 μ M ANA + 0,5 μ M TDZ	0,8452 a	2,3333 a	0,7202 a
0,009 μ M ANA + 1,0 μ M TDZ	0,9523 a	1,9888 a	0,4464 b
0,009 μ M ANA + 1,5 μ M TDZ	0,9940 a	1,9226 a	0,3988 b
0,09 μ M ANA + 0,5 μ M TDZ	0,8690 a	1,9881 a	0,3571 b
0,09 μ M ANA + 1,0 μ M TDZ	0,9881 a	1,1845 b	0,1309 c
0,09 μ M ANA + 1,5 μ M TDZ	0,9762 a	1,5892 a	0,2916 b
Ausência de reguladores + água de coco	0,7023 b	2,2619 a	0,7261 a
0,009 μ M ANA + 0,5 μ M TDZ + água de coco	0,9166 a	1,7619 b	0,3154 b
0,009 μ M ANA + 1,0 μ M TDZ + água de coco	0,8690 a	1,4166 b	0,2023 c
0,009 μ M ANA + 1,5 μ M TDZ + água de coco	0,8690 a	2,0535 a	0,3988 b
0,09 μ M ANA + 0,5 μ M TDZ + água de coco	0,9642 a	2,2023 a	0,4345 b
0,09 μ M ANA + 1,0 μ M TDZ + água de coco	0,9523 a	1,5000 b	0,1964 c
0,09 μ M ANA + 1,5 μ M TDZ + água de coco	0,9762 a	1,6487 b	0,3273 b

Observação: Médias seguidas das mesmas letras são iguais à $P \leq 0,05$ de acordo com teste de Scott-Knott

Dentre os melhores tratamentos, apesar de não diferir estatisticamente, o que apresentava a composição de meio MS com modificações acrescido de 0,009 μM ANA + 0,5 μM TDZ , sem a adição de água de coco, foi o que proporcionou 84,52% de presença de calos, 72,02% de presença de plantas e maior valor para a variável área do calo coberta por plântulas (2,3333), o que corresponde a mais de 50% de cobertura do calo por plântulas.

Uma análise econômica entre os dois melhores tratamentos nos possibilita fazer duas ponderações: os custos com os reguladores ANA e TDZ giram atualmente em torno de R\$ 1,78 por litro de meio produzindo, em média, 7.200 plântulas ao final do processo. O custo de cada plântula é, aproximadamente, R\$ 0,00024. Com a substituição por água de coco, o custo é de aproximadamente R\$ 0,72 para a mesma quantidade de meio, produzindo 6.000 plântulas a um valor aproximado de R\$ 0,00012 cada. Estes cálculos foram feitos levando-se em conta as porcentagens de formação de calos e regeneração apresentados na tabela 1 e a média de 60 plantas formadas por explante.

Estas estimativas nos permitem chegar a duas possibilidades de utilização do protocolo estabelecido. Como, para fins de transformação genética de plantas é desejável a maior presença de calos aliada à regeneração das mesmas, fato que aumenta a possibilidade da obtenção de um evento transformante, a utilização de meio MS com modificações acrescido de 0,009 μM ANA + 0,5 μM TDZ sem a adição de água de coco é considerado mais relevante. Porém, quando o objetivo do trabalho é a micropropagação, o tratamento que utiliza somente água de coco no meio MS com modificações possibilita um menor custo de produção o que é mais vantajoso para a produção massal de plântulas.

Há alguns estudos que reportam sucesso na regeneração de calos organogênicos para algumas espécies de *Eucalyptus* como os conduzidos por

Arezi, (2001) que trabalhou com *Eucalyptus camaldulensis* Prakash e Gurusurthi (2005) que estudaram *Eucalyptus tereticornis* e Tournier (2003), que trabalhou com o híbrido entre as mesmas espécies utilizadas neste trabalho. Porém, estes tinham como fonte de explantes tecidos juvenis como cotilédones e hipocótilos, advindos da germinação de sementes. Sabe-se que há desvantagens neste tipo de estratégia, pois apesar de tecidos juvenis apresentarem uma resposta organogênica favorável e rápida (LIU E PIJUT, 2008), as características de interesse do clone utilizado podem não se preservar pela variabilidade genética causada pela utilização de sementes (AGGARWALL et al. 2010). Assim, estes eventos organogênicos podem não ser uma boa alternativa para a utilização durante técnicas de transformação genética de clones promissores de eucalipto. Já os resultados obtidos neste trabalho abrem uma boa perspectiva para a utilização desta ferramenta, pois a partir do momento em que se utilizam tecidos maduros para a formação de calos e regeneração de plantas, as características de interesse da planta matriz (clone de interesse comercial) são mantidas.

Em estudos com explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna*, Dibax et al (2010) encontraram resultados favoráveis para a organogênese quando utilizaram formulação de meio MS com concentração reduzida de nitrogênio acrescido dos mesmos reguladores de crescimento utilizados no presente estudo porém em concentrações distintas. No entanto, no presente estudo, foi obtido um índice regeneração (cerca de 60 brotações por explante) bem superior ao trabalho citado anteriormente (13 brotações por explante).

Os resultados das avaliações de crescimento podem ser observados no gráfico 1, relativo ao peso médio dos calos (1A), percentual de crescimento (1B) e taxa de crescimento médio (1C) referem-se a dados de crescimento real, já que os mesmos calos foram pesados em todos os 9 pontos, durante o experimento.

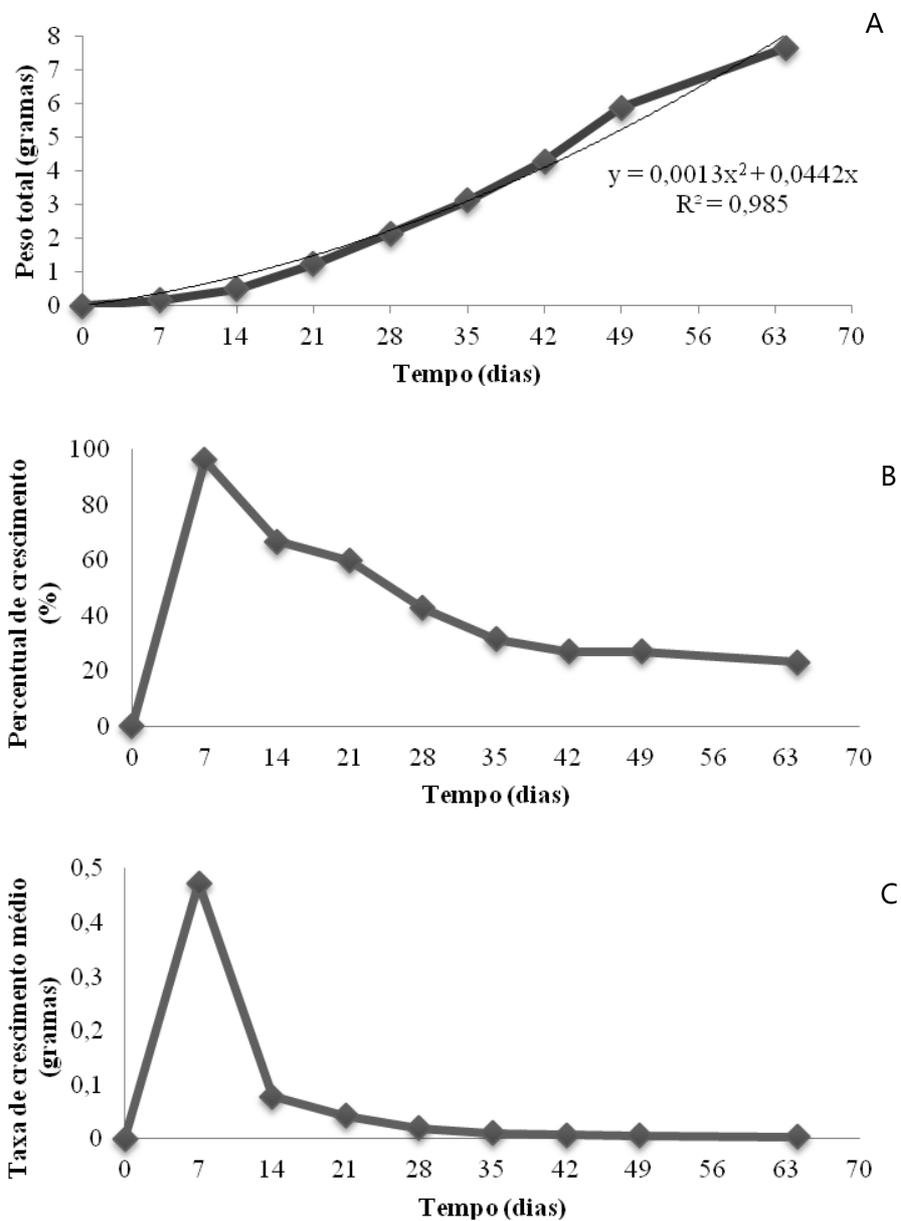


Gráfico 1 Acompanhamento do crescimento de calos organogênicos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. A – Peso de um total de 30 explantes/calos (gramas/dia); B – Percentagem de crescimento (%/dia); C – Taxa de crescimento médio (gramas/dia)

A curva de acompanhamento dos calos apresentou um padrão tipo sigmoide, com tendência de ganho de matéria fresca em função do aumento do tempo de cultivo. No período analisado (64 dias de cultivo), dentre as cinco fases de crescimento distintas pelas quais um calo normalmente passa -lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio - foi possível a observação somente das três primeiras. Fato que nos possibilita a especulação de que o protocolo utilizado mantém o potencial organogênico do material inoculado em nível ótimo para a maior regeneração de plântulas possível.

A fase lag é aquela em que as células do explante preparam-se para a divisão celular, acumulando biomassa. No presente estudo esta, ocorreu até o 7^o dia de inoculação, período em que foram observados a maior taxa de crescimento (0,47 gramas/dia), e o maior percentual de crescimento (96,34%) (Figura 2).

Vários estudos têm demonstrado que o período da fase lag varia de acordo com a espécie estudada. Em trabalhos envolvendo curva de crescimento de calos obtidos por meio de segmentos foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb), Landa et al. (2000), verificaram a ocorrência da fase lag até o 7^o dia de cultivo. Já Abbade (2010), estudando o desenvolvimento de calos de ipê-branco constatou que esta fase tem a duração de aproximadamente 30 dias.

A fase de crescimento exponencial é o período em que ocorre a máxima divisão celular, ocorrendo neste trabalho entre o 7^o e o 49^o dias após inoculação, com taxa de crescimento médio de 0,1 gramas/dia e percentual de crescimento de 42,46%. Este resultado corrobora com o encontrado por Landa et al. (2000), que observaram essa fase entre o 7^o e o 35^o dia de cultivo, com calos de segmentos foliares de pequiheiro. Abbade (2010), observou esta fase entre o 30^o e 45^o dias após a inoculação de explantes foliares de ipê branco com percentual de crescimento de 36%.

O período de crescimento linear, em que ocorre diminuição da divisão e aumento da área celular, foi observado entre o 49^o e o 64^o dia de cultivo, apresentando taxa de crescimento de 0,004 gramas/dia e 23,21% no último dia analisado. Resultados semelhantes foram observados por Abbade (2010), na fase entre 45 e 60 dias de inoculação, porém o percentual de crescimento correspondeu à 57%. Lima et al. (2007), observaram que a fase linear da curva de crescimento para explantes foliares de sangra-d'água (*Croton urucurana*) ocorreu somente entre o 70^o e o 98^o dia de cultivo.

As análises histológicas realizadas corroboram com os resultados descritos anteriormente, pois, observa-se uma grande proliferação de células até 42^o dia após a inoculação o que está de acordo com o crescimento exponencial observado. Posteriormente a este período há a organização e diferenciação de células em estruturas referentes à parte aérea da plântula o que ocorre ao mesmo tempo em que há o crescimento linear (Figura 3).

A figura 3a corresponde ao explante inicial composto pelo apice meristemático apical caulinar. A figura 3b é relacionada ao começo da desdiferenciação celular das folhas do apice meristemático após 15 dias de inoculação. Nesta, observa-se que o calo se origina da face abaxial da folha, mais especificamente da camada subepidermica no parenquima esponjoso.

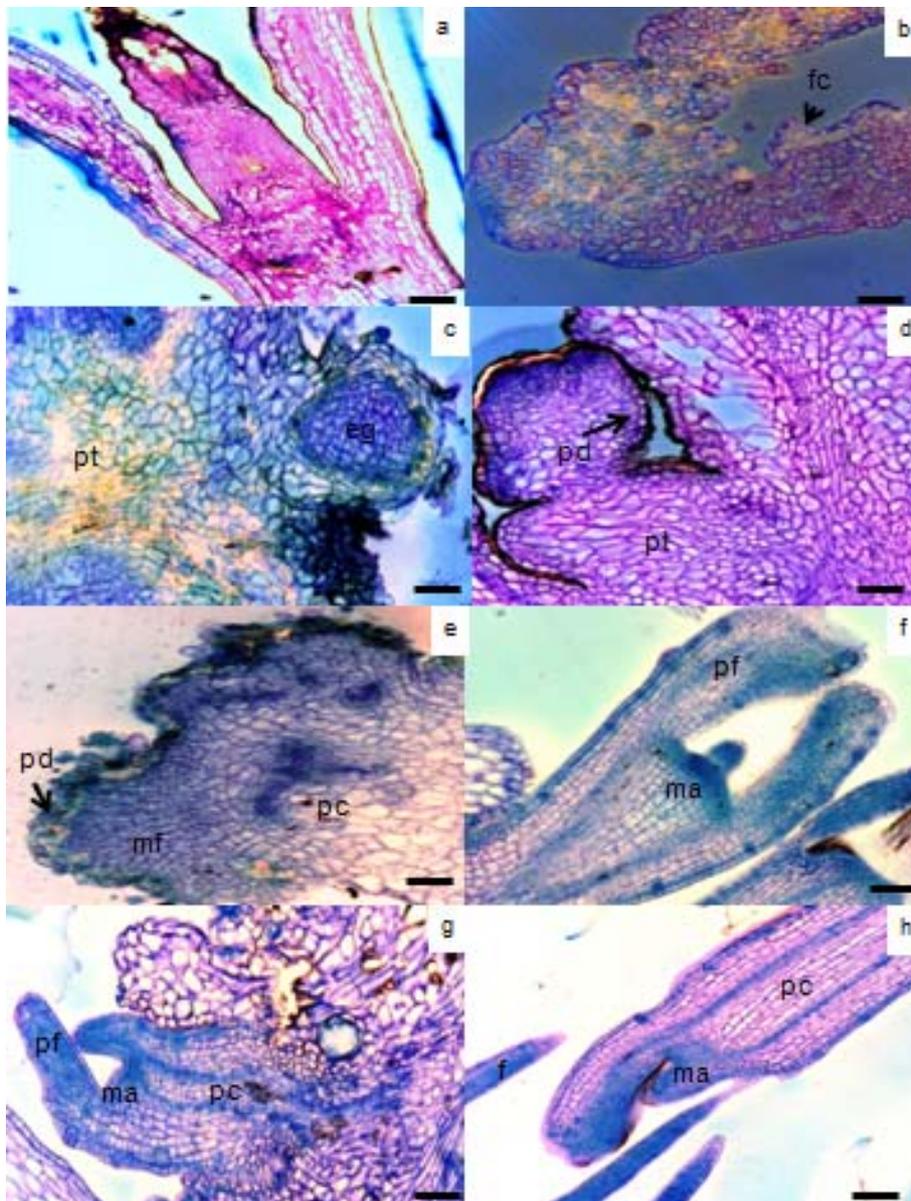


Figura 3 Cortes histológicas coradas com azul de toluidina do explante inicial e calos de *E. grandis* x *E. urophylla* inoculados em meio MS com modificações 0,1247 mg.L⁻¹ de ANA e 0,2499 mg.L⁻¹ de BAP. a – após inoculação, b- 14 dias, c e d - 28 dias, e e f – 42 dias, g e h- 64 dias (Barra 100µm). fc- formação de calo, pt- parênquima de transfusão, pd- protoderme, mf- meristema fundamental, pc- procâmbio, ma- meristema apical, pf- primórdio foliar, f- folha.

Após 30 dias de inoculação, os calos estão devidamente formados, observam-se estruturas em formato globular com células de parenquima de transfusão (figura 3c) e o início da formação de protoderme, além de um aumento na densidade de células marcado por intensas divisões celulares (figura 3d). Aos 42 dias, observa-se a formação de protoderme em um estágio mais avançado. Observa-se também a diferenciação do meristema fundamental e do procâmbio que ainda está ligado às células do parênquima de transfusão (figura 3e). Além destas estruturas, pode-se notar também em outras regiões do calo um estágio mais avançado de diferenciação, que é marcado pelo desenvolvimento de primórdios foliares e meristemas apicais caulinares (figura 3f).

Após os 64 dias de inoculação, ocorre a formação de partes aéreas de plântulas bem definidas, compostas por meristemas apicais e folhas desenvolvidas. Há também o começo da diferenciação do procâmbio em feixes vasculares (figura 3 g,h).

Análises histológicas em estudos de organogênese *in vitro* são fundamentais para a confirmação da fonte das brotações formadas na cultura, excluindo a possibilidade de interpretações equivocadas de resultados pela presença de gemas pré-formadas no material original (HERVÉ et al., 2001 e CARVALHO et al., 2004). Ainda segundo Hervé et al. (2001), o conhecimento do sítio exato em que ocorrem as divisões celulares antes da formação do calo, é importante para estudos de transformação genética, porque indicam a superfície de origem dos brotos adventícios. Este fato possibilita a adequação de protocolos de infecção direcionada para os trabalhos de transformação genética.

Estruturas globulares que dão origem a plântulas semelhantes às obtidas neste trabalho também foram encontradas em estudos histológicos de organogênese de explantes cotiledonares (DIBAX, 2010) e foliares (MENDONÇA, 2009) de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn.

Após o período de aclimatização as plântulas apresentaram 59,61% de sobrevivência. Resultado satisfatório se comparados com o de Mendonça (2009), que obteve um valor médio de sobrevivência de 50% na aclimatização de *Eucalyptus camaldulensis*. Já resultado superior foi encontrado por Bandeira et al. (2007) que, avaliando clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* enxertados *in vitro*, observaram a sobrevivência de 87% das plantas.

4 CONCLUSÃO

Obteve-se um protocolo eficiente para a organogênese e regeneração de plantas para um híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* utilizando-se explantes meristemáticos.

Os resultados de acompanhamento de crescimento e histologia conseguidos por este trabalho indicam que o protocolo de organogênese estabelecido, mantém o material em alto potencial de desenvolvimento, obtendo-se plântulas que podem perfeitamente serem inseridas em campo.

Considerando o que foi exposto e a eficiência na obtenção de plântulas por calo formado, este torna-se uma excelente opção a ser utilizada para trabalhos visando a transformação genética de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADE, L. C. et al. Growth Curve and biochemical analyses of callus of Ipê-Branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.). **Naturalia**, Rio Claro, v. 33, p. 45-56, 2010.

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Shoot organogenesis in elite clones of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, p. 45–52, 2010.

AREZKI, O. et al. Changes in peroxidase activity and level of phenolic compounds during light-induced plantlet regeneration from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. nodes *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 33, p. 215–219, 2001.

BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, Melbourne, v. 13, p. 79–148, 2000.

CARVALHO D. C.; BIASI, L. A. Organogênese do caquizeiro a partir de segmentos radiculares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5 p. 1401-1406, set./out. 2004.

DIBAX, R. et al. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *eucalyptus saligna* with P5CS gene. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 1, p. 6-12, 2010a.

DIBAX, R. et al. Plant Regeneration os *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and histological study of organogenesis *in vitro*. **Brazilian archieves of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 311-318, Marc./Apr. 2010b.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3**: sistema de análises estatísticas. Lavras: [s. n.], 1999.

GOLLE, D, P. et al. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1606-1613, ago. 2009.

HERVÉ, P. et al. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative **Phistology Plant Science**, Limerick, v. 161, p. 645-653, 2001.

LAMEIRA, O. A. et al. Estabelecimento da curva de crescimento em calos de Erva-baleeira (*Cordia Verbenacea* L.). **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 4, n. 1, p. 92-93, 1996.

LANDA, F. S. L. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000.

LIMA, E. C. et al. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos *in vitro* a partir de segmentos foliares de Sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, p. 1055-1065, 2007.

LIU, X.; PIJUT, P. M. Plant regeneration from *in vitro* leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 94, n. 3, p. 113–123, 2008.

MENDONÇA, E. G. **Micropropagação e transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis***. 2009. 71 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Sm. **Current Science**, Columbus, v. 88, p. 1311–1316, 2005.

SARTORETTO, M. L. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

TEIXEIRA, J. B. et al. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39 p. (Documentos, 121).

TOURNIER, V. et al. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Reports**, London, v. 12, n. 4, p. 403-411, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1024217910354>>. Acesso em: 22 dez. 2011.

ARTIGO 2

**Embriogênese somática em explantes foliares e meristemáticos de
Eucalyptus grandis x *Eucalyptus urophylla***

RESUMO

O gênero *Eucalyptus* inclui a maioria das espécies florestais utilizadas no estabelecimento de plantações em áreas tropicais e subtropicais do mundo, sendo a clonagem de indivíduos superiores uma alternativa de fundamental importância e aplicação no setor florestal. Dentre as possibilidades de propagação massal do gênero *Eucalyptus*, está o uso de embriões somáticos, especialmente para aquelas espécies ou clones de difícil enraizamento, proporcionando assim uma alternativa ao enraizamento de brotações micropropagadas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o de tentar estabelecer um protocolo de embriogênese somática para um híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* e observar o desenvolvimento dos calos obtidos por meio de análises anatômicas e ultraestruturais. Folhas e meristemas de plantas mantidas em viveiro foram desinfestados e inoculados em placas de petri contendo MS na ausência e suplementado com diferentes concentrações do regulador de crescimento dicamba (0,25; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹). Após a avaliação e análises microscópicas e ultraestruturais pode-se afirmar que o melhor meio dentre os testados para a formação de embriões somáticos em meristemas de *E. grandis* x *E. urophylla* foi o meio MS suplementado com 0,25 mg.L⁻¹ de dicamba.

Palavras chave: *Eucalyptus*. Embriogênese somática. Dicamba. Embriões.

ABSTRACT

The genus *Eucalyptus* includes the most species used in the establishment of forest plantations in tropical and subtropical areas of the world, and the cloning of superior individuals was an important alternative for the application in forestry. Among the possibilities for mass propagation of the genus *Eucalyptus* is the use of embryos, especially for those species or clones with difficult rooting, thus providing an alternative to rooting micropropagated shoots. Thus, the aim was to try to establish a protocol for somatic embryogenesis of a hybrid of *E. grandis* x *E. urophylla* and observe the development of calluses obtained from anatomical and ultrastructural analysis. Meristems and leaves of plants that grown in nurseries were surface sterilized and inoculated in Petri dishes in the absence and MS supplemented with different concentrations of growth regulator dicamba (0.25, 1.0 and 2.0 mg.l⁻¹). After the microscopic and ultrastructural analyzes evaluation can be said that the best method among those tested for the formation of somatic embryos in meristems of *E. grandis* x *E. urophylla* was MS medium supplemented with 0.25 mg.l⁻¹ of dicamba.

Keywords: *Eucalyptus*. Somatic embriogenesis. Dicamba. Embryos.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as novas tecnologias destinadas ao aprimoramento da clonagem de *Eucalyptus*, a embriogênese somática tem despertado interesse especial por parte de instituições de pesquisa e empresas florestais brasileiras que possuem avançados programas de melhoramento genético e de clonagem (TITON et al, 2007).

Nas últimas décadas a embriogênese somática foi desenvolvida com o intuito de propiciar uma rápida multiplicação de inúmeras espécies, e, passou a ser utilizada não somente como uma técnica de pesquisa, mas com o interesse industrial (PINTO, et. al. 2011). Atualmente, figura como uma das técnicas de maior interesse na cultura de tecidos vegetais e pode ser entendida como um processo pelo qual células somáticas diferenciam-se em embriões.

A embriogênese somática oferece muitas vantagens incluindo a presença de dois meristemas e a possibilidade de multiplicação em massa de material modificado geneticamente, além da possibilidade de manter culturas embriogênicas através de criopreservação enquanto as plantas regeneradas são testadas em campo (PARK et al. 1992, 1998).

Dentro do gênero *Eucalyptus*, a embriogênese somática foi descrita para *E. citriodora* utilizando meio B5 (MURALIDHARAN; GUPTA; MASCARENHAS, 1989; MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1987), *E. dunnii* e *E. tereticornis* utilizando B5 e MS (PRAKASH; GURUMURTHI, 2005; TERMIGNONI; WANG; HU, 1996; WATT et al., 1999), *E. grandis* e *E. nitens* com o MS (BANDYOPADHYAY et al., 1999; WATT et al., 1999), *E. globulus* usando metade da concentração dos sais de MS (NUGENT et al., 2001; PINTO et al., 2008). Porém estudos aprofundados quanto à histologia dos calos e embriões obtidos ainda são escassos.

O conhecimento da morfologia das células assim como de suas características ultraestruturais tornam-se importantes para inferir se um calo possui características embriogênicas. Estas análises são feitas por meio de microscopia fotônica e eletrônica. Os resultados obtidos podem auxiliar no entendimento do comportamento dos calos embriogênicos no meio de cultura, aumentando a eficiência da obtenção de protocolos de embriogênese somática. (NOGUEIRA, 2006).

Assim, o presente estudo teve por objetivo, o detalhamento de protocolos de indução de embriogênese somática em meristemas e folhas de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e a análise histológica e ultraestrutural dos mesmos.

2 MATERIAL E METODOS

2.1 Local dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Central de Biologia Molecular e no Laboratório de Microscopia Eletrônica, ambos localizados no campus da Universidade Federal de Lavras.

2.2 Material vegetal

O material vegetal utilizado neste trabalho foi obtido de híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* mantidos em viveiro comercial.

2.3 Embriogênese

Meristemas e folhas, isolados de brotações de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, foram utilizados como explantes. Estes foram coletados, levados para câmara de fluxo laminar e desinfestados por meio da exposição à pastilhas de paraformaldeído durante 40 minutos. Em seguida, os meristemas foram excisados com o auxílio de um bisturi e para o procedimento foi utilizada uma lupa estereomicroscópica (Zeiss Stemi 2000).

Os explantes foram inoculados em placas de petri contendo 30 mL de meio de cultura MS suplementado com 3% de sacarose e combinado com distintas concentrações do regulador de crescimento dicamba (0,25; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) e na ausência deste. Os meios foram solidificados com 0,6% de ágar e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121^oC por 20 minutos.

O experimento foi mantido em sala de crescimento com temperatura de aproximadamente 25°C, na ausência de luz por um período de 150 dias. Após este período foi avaliado a quantidade de embriões formados e a fase de desenvolvimento embrionário em que estes se encontravam.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos, 5 repetições e 7 parcelas.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Sisvar[®] (Ferreira, 2000) com teste de Tukey à 5% de significância, sendo os dados transformados pela equação $\sqrt{y + 0,5} - \text{SQR}(y + 0,5)$ para a variável número de embriões e não foram transformados para a variável fase de desenvolvimento do embrião.

Após 150 dias os calos foram transferidos para meio MS sem a adição de reguladores de crescimento e mantidos em fotoperíodo de 16 horas a intensidade luminosa $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.4 Análises ultraestruturais

Após 60 dias da inoculação, os calos originados de folhas foram separados segundo a coloração que apresentavam. A região com coloração amarelo-claro foi denominada de Tipo I, a região amarelo-escuro Tipo II e a região que apresentou coloração marrom foi denominada de calo Tipo III.

Amostras de calos oriundos de meristemas e dos três tipos obtidos de folhas foram coletadas e imersas em solução fixadora Karnovisk (pH 7,2) e mantidas em tubos eppendorf por um período de 72 horas.

Posteriormente, em capela de exaustão, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,05 M por três vezes por 10 minutos e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em água, por 3 horas, em temperatura ambiente. Após esse período, foram lavadas por três vezes por 10 minutos em água destilada e,

em seguida, desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100 %, nesta última por três vezes), onde permaneceram por 10 minutos.

Após a desidratação, os calos foram conduzidos ao aparelho de ponto crítico para a secagem e, então, montados em *stubs* para cobertura com ouro.

Os calos foram armazenados em dessecadores contendo sílica gel. As amostras foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO Evo 40 e as micrografias obtidas foram analisadas pelo programa Corel DRAW.

2.5 Análises histológicas

Após 90 dias da inoculação, amostras de calos originados de folhas e meristemas foram coletadas e fixadas em FAA50 (formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico, 50%) por 48 horas, em seguida, conservadas em álcool etílico 70%. Em seqüência desidratadas em etanol e emblocadas em historesina Leica de acordo com o protocolo do fabricante com pequenas modificações. Foram feitos cortes com espessura de 5µm em micrótomo de rotação. Estes foram corados com azul de toluidina na concentração de 0,1% e visualizados em microscópio óptico Leica nas objetivas de 10X e 20X.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Nos tratamentos em que folhas foram utilizadas como explantes, houve muitas mortes por contaminação e oxidação do material, fato que impossibilitou a contagem do número de embriões por tratamento. Assim, não houve a possibilidade de se realizar a análise estatística destes, porém, foram realizadas as análises anatômicas e ultraestruturais do material.

Para os tratamentos em que foram utilizados meristemas como fonte de explante, foi possível observar a indução da embriogênese somática aos 90 dias após a inoculação em meio de cultura. Neste tempo, foi observada a formação de embriões nos tratamentos que continham auxina mostrando ser o regulador de crescimento dicamba eficiente na resposta de calos à embriogênese (Figura 1).

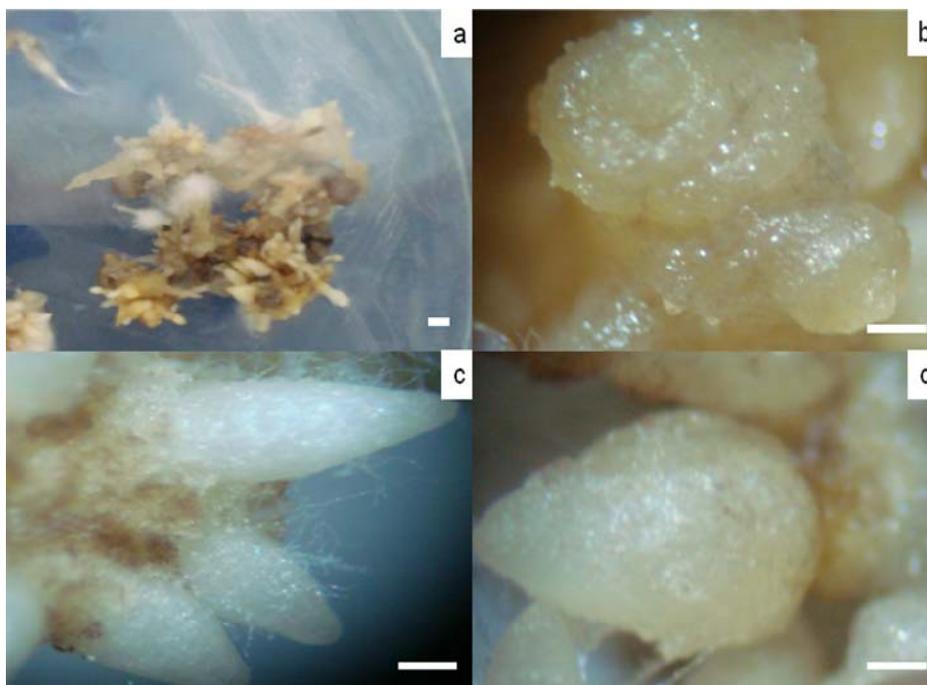


Figura 1 Aspecto visual dos calos obtidos no tratamento que consistia de meio MS suplementado com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de dicamba. Calo (a); embrião em estágio globular (b); Embrião em estágio de torpedo (c; d). (Barra: 0,5 cm)

O tratamento que consistia de meio de cultura MS suplementado com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de dicamba foi significativamente superior aos outros proporcionando um maior número total de embriões e além de ser o único a produzir embriões em todas as fases de desenvolvimento, como pode ser observado no gráfico 1.

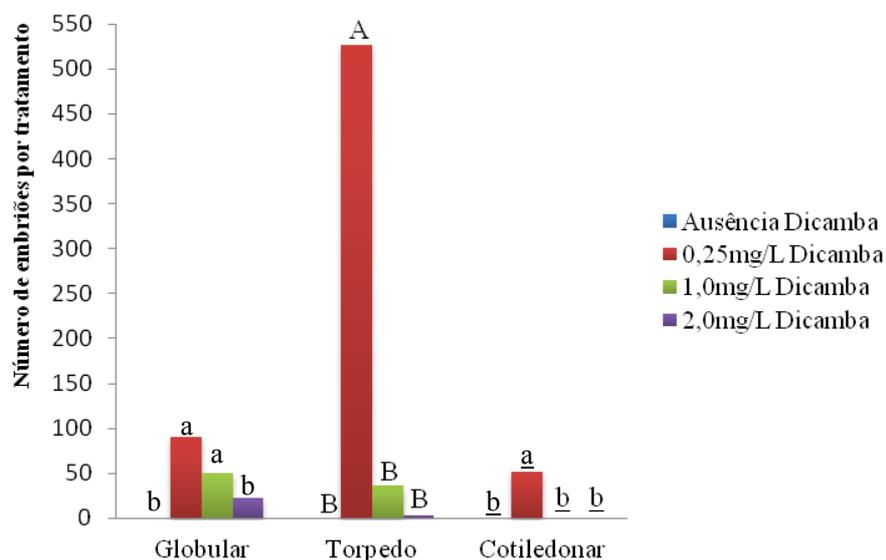


Gráfico 1 Número total de embriões por tratamento e número de embriões organizados por fase de desenvolvimento por tratamento.

O mesmo meio destacou-se também no número de embriões formados por calo, apresentando aproximadamente 19 embriões por calo formado, em detrimento dos demais tratamentos que não apresentaram a formação de embriões ou o obtiveram em número reduzido, como pode ser observado no gráfico 2.

Pereira (2007), afirma que foram formados em média, 45 embriões somáticos em explantes foliares de *Coffea arabica* l. cv. Acaia cerrado quando se adicionou ao meio de cultura cinetina na concentração de $5,6 \text{ mg.L}^{-1}$ combinada com 10 mg.L^{-1} de GA_3 , sendo que a maior parte destes estava no estágio de torpedo. Resultados superiores aos encontrados neste trabalho. O uso de citocinina e giberelinas no meio de cultura pode ter levado a um maior desenvolvimento dos embriões, pois, segundo os mesmos autores, uma alta relação auxina/citocinina é necessária para a formação de calos não diferenciados em um meio de cultura inicial e a baixa relação para a indução de

calos embriogênicos durante culturas subseqüentes. No presente trabalho, esta relação começou alta com a utilização da auxina dicamba no início da cultura, que possivelmente se degradou com o tempo, diminuindo assim a razão auxina/citocinina e causando o desenvolvimento dos embriões.

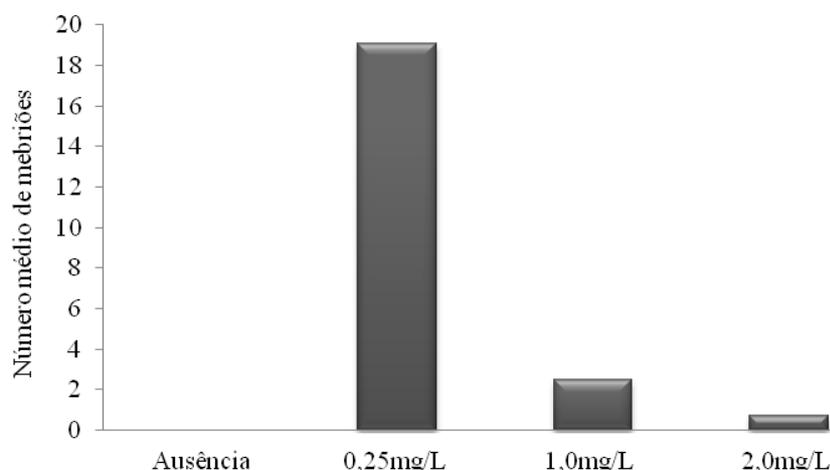


Gráfico 2 Número de embriões por calo por tratamento em função de distintas concentrações de dicamba.

Segundo Pinto et al. (2002), a regeneração de plântulas por meio de embriogênese somática foi reportada para várias espécies do gênero *Eucalyptus*, como para *E. citriodora* (MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1987; MURALIDHARAN; GUPTA; MASCARENHAS, 1989), *E. dunnii* (TERMIGNONI; WANG; HU, 1996) *E. grandis* (WATT et al., 1991), *E. nitens* (BANDYOPADHYAY et al., 1999; BANDYOPADHYAY; HAMILL, 2000) e *E. globulus* (BANDYOPADHYAY et al. 1999; NUGENT et al., 2001).

A regeneração de plântulas não foi alcançada neste trabalho, pois os embriões, quando transferidos para meio de cultura sem regulador de crescimento e para intensidade luminosa $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ morreram, o que não

ocorreu no experimento reportado por Pinto et al (2002) que trabalharam com *E. globulus*. Os mesmos autores transferiram embriões no estágio globular para meio MS com a presença de caseína hidrolisada e glutamina (suplementos nitrogenados) e observaram uma maior formação de raízes a partir destes embriões. Segundo Amirato et al (1993) meios enriquecidos com nitrogênio são fundamentais para a embriogênese somática, bem como para a diferenciação da parte aérea. A pouca quantidade de nitrogênio a que os embriões foram submetidos para a regeneração de plântulas ou a demora na inoculação dos embriões em meio sem reguladores de crescimento pode explicar o insucesso nesta etapa do processo no presente trabalho.

A oxidação e conseqüente morte dos embriões também pode ser explicada pela alta concentração de fenóis no meio de cultura. Nugent et. al (2001) relata que um dos principais problemas que promovem o fracasso da regeneração quando se trata de embriogênese somática em eucalipto é o acúmulo de compostos fenólicos.

Em trabalho desenvolvido com *Eucalyptus grandis*, Titon (2007), afirma que aos 30 dias de inoculação de hipocótilos e cotilédones em meio de cultura MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de dicamba foram observadas estruturas semelhantes à embriões somáticos em estágio cordiforme e torpedo, de coloração amarelo-clara. Resultados que estão em conformidade com os obtidos neste trabalho, levando-se em conta que para tecidos maduros, a desdiferenciação e rediferenciação das células ocorrem em maior tempo.

Quanto às análises ultraestruturais dos calos obtidos de folhas e classificados quanto à coloração observou-se que as células do calo Tipo I (Figura 4a) apresentaram predominantemente formato arredondado (Figura 4b). Foi possível a distinção de regiões em organização esférica, semelhantes a embriões somáticos em estágio globular. Segundo Jimenez (2001), o formato isodiamétrico é característico de células meristemáticas sendo que os calos

embriogênicos são compostos, em sua maioria, por células meristemáticas com dimensões relativamente pequenas e com citoplasma denso. Estruturas semelhantes à embrióides foram observadas em explantes foliares de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) por Ferreira et al (2005). Chaudhury e Qu, (2000), disseram que calos de *Cynodon dactylon*, apresentaram estruturas de coloração amarelada e células arredondadas, caracterizando células com potencial meristemático. Estes resultados são semelhantes ao obtido por este trabalho.

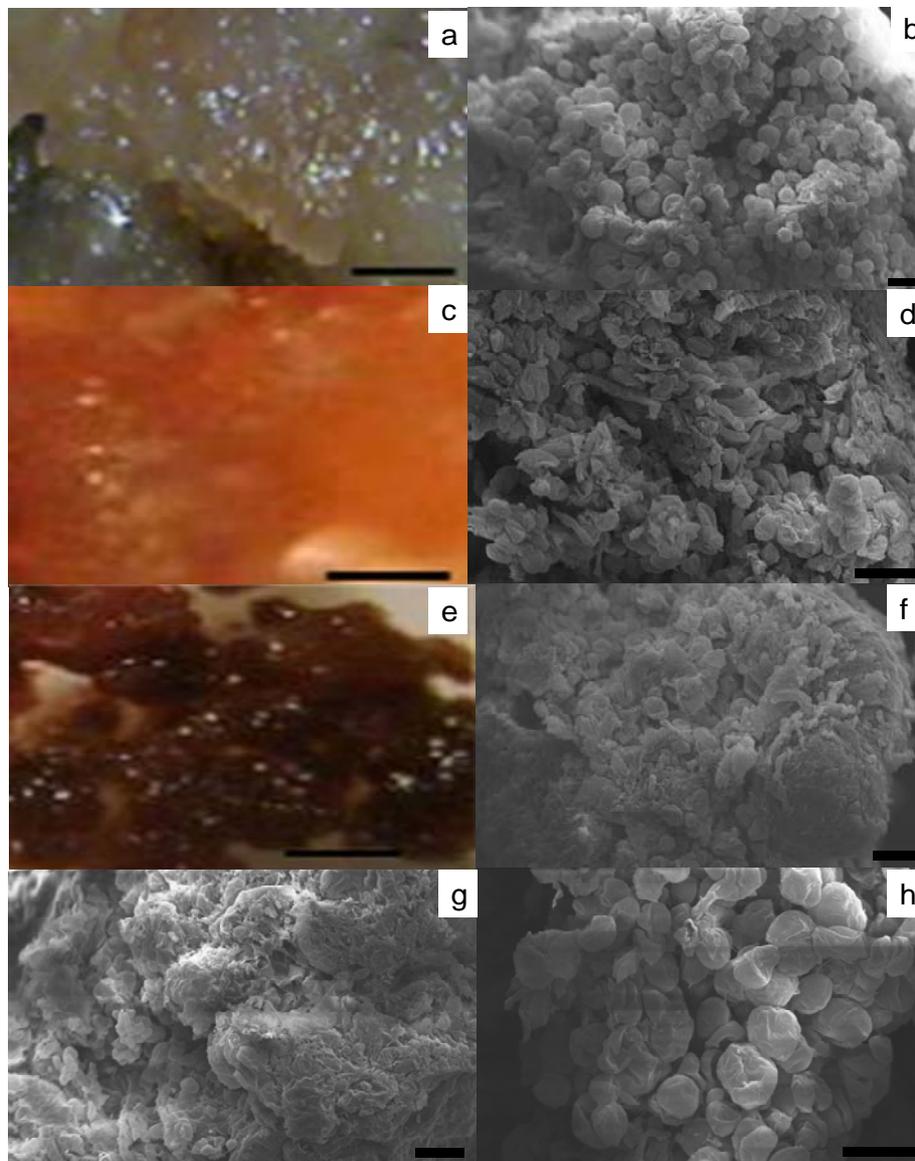


Figura 4 Fotografias e eletromicrografias de varredura de células obtidas de calos de *E. urograndis*. Calo derivado de folhas e classificados quanto à coloração em: amarelo claro – Tipo I (a; b), amarelo escuro – Tipo II (c; d) e marrom – Tipo III (e; f). Calos oriundos de meristemas (g; h).

As células do calo Tipo II (Figura 4c) apresentaram formato alongado, sendo este tipo de célula característico de calos não embriogênicos (Figura 4d). As células isodiamétricas são menores e com citoplasma denso, e as células alongadas apresentaram vacuolização. A ruptura da membrana e a vacuolização são características de morte celular (FILONOVA et al., 2000). Já no calo Tipo III (Figura 4e), foi observado uma massa de células indiferenciada com aspecto compacto. Nesse tipo de calo a diferenciação das estruturas celulares não ocorreu (Figura 4f).

Já as células dos calos obtidos de meristemas apresentaram regiões com células de formato não definido e poucas regiões com células grandes de formato irregular, o que sugere que este calo pode estar em processo de diferenciação (Figuras 4g e 4h).

Nos estudos anatômicos, pode-se observar que os calos obtidos de explantes foliares apresentaram regiões com células grandes e dispersas, sendo estas consideradas inviáveis (Figura 5a). Foi possível observar também regiões meristemáticas de células com núcleo evidente (Figura 5c) e dispostas em aglomerados o que é característico de células com potencial embriogênico. A visualização de embriões somáticos no estágio globular também foi realizada (Figura 5b).

Nos calos induzidos a partir de meristemas foi possível visualizar a formação de embriões somáticos nos estádios embriogênicos distintos: globular, cordiforme e torpeda, figuras 5d, 5e e 5f, respectivamente.

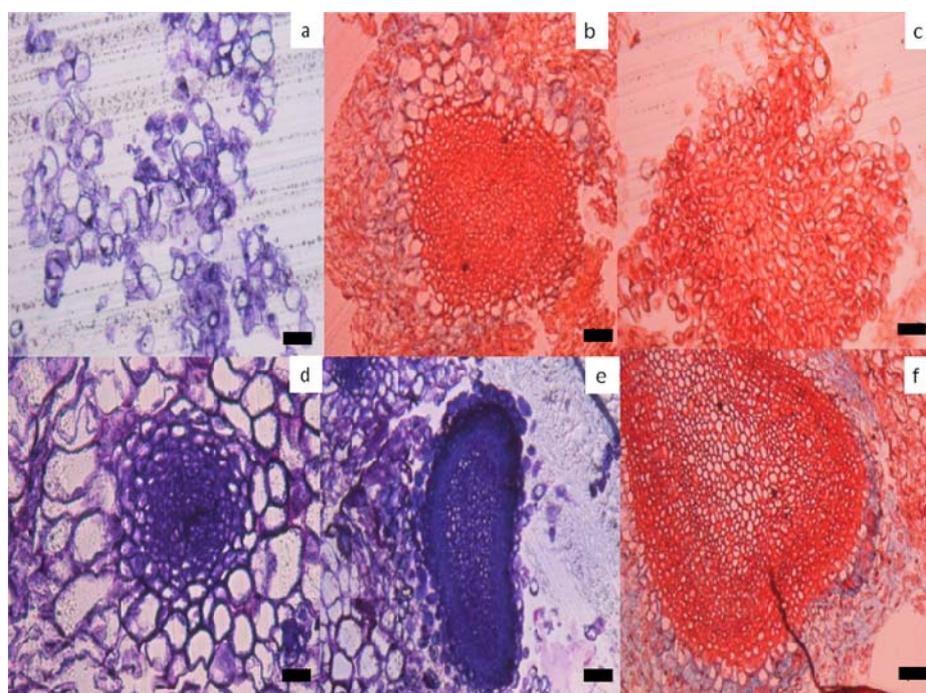


Figura 5 Cortes histológicos de calos de *Eucalyptus grandis X Eucalyptus urophylla*. (a) Células inviáveis derivadas de explantes foliares coradas com azul de toluidina. (b) Embrião somático obtido de explantes foliares corado com safranina (c) Células viáveis (núcleos e aglomerados celulares) de explantes foliares coradas com safranina (d) Embrião somático globular obtido de meristema corado com azul de toluidina (e) Embrião em estágio de torpedo corado com azul de toluidina (f) Embrião no estágio cordiforme corado com safranina. (Barra 50 μ m).

Pode-se inferir que o desenvolvimento dos calos e dos estádios embriogênicos demonstrou ser assincronizado, ou seja, os calos mantidos no mesmo meio de cultivo e durante o mesmo período de tempo apresentaram diferentes estádios de desenvolvimento. De acordo com Pinto (2008) que observou que em calos desenvolvidos de embriões zigóticos maduros de *E.*

globulus o assincronismo é mais evidente em explantes que após a formação dos primeiros embriões continuavam no mesmo meio basal, em comparação com aqueles que foram transferidos para meios sem a presença de reguladores de crescimento.

Possivelmente, o tempo necessário para a indução de embriões em explantes meristemáticos e foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* seja menor do que a relatada neste trabalho, fato que é evidenciado pelo assincronismo de estádios apresentado.

4 CONCLUSÃO

O meio de cultura MS suplementado com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de dicamba é eficiente na formação de embriões somáticos em explantes foliares e meristemáticos de um híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

Diferentes estádios embrionários foram obtidos e confirmados pelas análises histológicas e ultraestruturais.

Necessita-se de mais estudos quanto à regeneração de embriões somáticos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRATO, P. G. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A. et al. **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMilam, 1993. v. 1, 123 p.

BANDYOPADHYAY, S. et al. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species - *Eucalyptus nitens* and *E globulus*. **Plant Science**, Limerick, v. 140, n. 2, p. 189–198, 1999.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais**. São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, M. G. R. et al. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 27, n. 3, p. 500-503, dez. 2005.

FILONOVA, L. H. BOZHKOVA, P. V.; BRUKHIN, V. B. et al. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, *Norway spruce*. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, p. 4399-4411, nov. 2000.

JIMENEZ, V. L. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.

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**, Berlin, 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**, Berlin, v. 6, p. 256–259, 1987.

NOGUEIRA, R. C. Caracterização de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermédia* A. Juss.). 2006. 41 p. **Tese** (Doutorado em Agronomia: Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

NUGENT, G. et al. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 67, p. 85–88, 2001.

PARK, Y. S.; BARRET, D.; BONGA, J. M. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. **In vitro Cell Development Biology Plant**, Raleigh, v. 34, p. 231–239, 1998.

PEREIRA, A. R. et al. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Acaia Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 332-336, 2007.

PINTO, G. et al. Acclimatization of secondary somatic embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill.: an ultrastructural approach. **Trees**, Santa Monica, v. 25, p. 383–392, 2011.

PINTO, G. et al. Genetic control of somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 1093–1101, 2008.

PINTO, G. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, p. 208–213, 2002.

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Sm. **Current Science**, Columbus, v. 88, p. 1311–1316, 2005.

TERMIGNONI, R.; WANG, P. J.; HU, C. Y. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 45, p. 129–132, 1996.

TITON, M. et al. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 3, 2007.

WATT, M. P. et al. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, Pretoria, v. 157, p. 59–65, 1991.

WATT, M. P. et al. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii*. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Kluwer: [s. n.], 1999. v. 5, p. 63-78.