

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE CALOS DE *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake SOB CONCENTRAÇÕES DE BORO E CÁLCIO

Raquel Trevizam¹, Gilvano Ebling Brondani², Felipe Uassurê Nery³, Antonio Natal Gonçalves⁴,
Marcilio de Almeida⁵

(recebido: 12 de dezembro de 2009; aceito: 25 de fevereiro de 2011)

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de B e Ca nas respostas morfológicas e tamanho de calos de *Eucalyptus urophylla*, obtidos a partir da porção mediana de hipocótilos excisados de plântulas germinadas *in vitro*. As estruturas calogênicas foram cultivadas por períodos de 21 e 31 dias, sendo mantidas no meio N7 modificado nas concentrações de B (0, 25, 50, 100 e 200 μM de H_3BO_3) e Ca (0; 3,75; 7,5; 11,25 e 15 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Os calos foram analisados quanto ao tamanho, presença de raízes, friabilidade, aspecto gelatinoso, presença de estruturas globulares na superfície e presença de pigmentos. De maneira geral, o menor tempo de cultivo (21 dias) possibilitou melhor desenvolvimento das estruturas calogênicas. A combinação de 50 μM de H_3BO_3 e 7,5 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ aos 21 dias, e de 100 μM de H_3BO_3 e 1,13 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ aos 31 dias, promoveram os melhores resultados. A rizogênese respondeu de forma variável às concentrações de B e Ca. A omissão simultânea de B e Ca inibiu a rizogênese, causou a desestruturação dos calos, e favoreceu a formação de estruturas globulares e friáveis, com a ocorrência de antocianina. Concentrações elevadas de cálcio promoveram a indução de raízes nos calos.

Palavras-chave: Meio de cultura, nutrição mineral, cultivo *in vitro*, cultura de tecidos, rizogênese.

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CALLI OF *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake SUBJECTED TO CONCENTRATIONS OF BORON AND CALCIUM

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the effect of B and Ca concentrations on morphological responses and size of calli in *Eucalyptus urophylla*. Calli were obtained from the mid portion of hypocotyls removed from *in vitro* germinated seedlings. The callus structures were cultivated for 21 and 31 days, being kept in a modified N7 medium with concentrations of B (0; 25; 50; 100 and 200 μM H_3BO_3) and Ca (0; 3.75; 7.5; 11.25 and 15 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Size of calli, presence of roots, friability, viscosity, presence of globular structures on the surface and presence of pigments were analyzed. Overall, the shorter culture period (21 days) allowed better development of callus structures. The combination of 50 μM H_3BO_3 with 7.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ at 21 days, and 100 μM H_3BO_3 with 1.13 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ at 31 days, provided best results. Rhizogenesis responded differently according to B and Ca concentrations. Simultaneous omission of B and Ca inhibited the rhizogenesis, causing disruption of the callus, favored formation of globular and friable structures, with presence of anthocyanin. High concentrations of calcium promoted root induction in calli.

Key words: Culture medium, mineral nutrition, *in vitro* cultivation, tissue culture, rhizogenesis.

1 INTRODUÇÃO

A morfologia vegetal consiste na investigação da forma ou da estrutura da planta, podendo ser interpretada de acordo com o formato externo (HAJARI et al., 2006; NEHRA et al., 2005). A importância deste aspecto em estudos com organismos vegetais deve-se às relações com que este parâmetro se apresenta quando relacionado à fisiologia vegetal. Quando um explante é inoculado *in vitro*, diversas respostas são esperadas e a determinação de fatores

químicos, morfológicos e fisiológicos dos tecidos de plantas doadoras têm sido fundamentais (GLOCKE et al., 2006).

Diferentes respostas morfogenéticas são observadas no cultivo *in vitro* de espécies vegetais em meios suplementados com reguladores de crescimento, sendo que as respostas também estão ligadas ao balanço nutricional do meio de cultura (GEORGE, 1993; GUNTER et al., 2007; MUSSIO; RUSIG, 2009). Dessa forma, a nutrição mineral pode influenciar a morfologia vegetal de várias maneiras, podendo se destacar a atuação do cálcio (Ca) e do boro (B).

¹Engenheira Florestal, Dr^a. em Recursos Florestais – Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ESALQ – Universidade de São Paulo/USP – Avenida Pádua Dias, 11 – Cx. P. 09 – 13418-900 – Piracicaba, SP – trevisan@esalq.usp.br

²Engenheiro Florestal, Doutorando em Recursos Florestais, Bolsista FAPESP – Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo/USP – Avenida Pádua Dias, 11 – Cx. P. 09 – 13418-900 – Piracicaba, SP – brondani@esalq.usp.br

³Engenheiro Agrônomo, Mestrando em Recursos Florestais – Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ESALQ – Universidade de São Paulo/USP – Avenida Pádua Dias, 11 – Cx. P. 09 – 13418-900 – Piracicaba, SP – funery@usp.br

⁴Engenheiro Agrônomo, Professor Dr. em Agronomia – Departamento de Ciências Florestais – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ESALQ – Universidade de São Paulo/USP – Avenida Pádua Dias, 11 – Cx. P. 09 – 13418-900 – Piracicaba, SP – natalgon@esalq.usp.br

⁵Biólogo, Professor Dr. em Botânica – Departamento de Botânica – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ESALQ – Universidade de São Paulo/USP – Avenida Pádua Dias, 11 – Cx. P. 09 – 13418-900 – Piracicaba, SP – malmeida@esalq.usp.br

O Ca se destaca como constituinte da lamela média (integridade da parede celular). A deficiência de Ca pode afetar particularmente os pontos de crescimento da raiz, com o surgimento de núcleos poliplóides, células binucleadas, núcleos conscritos, divisões amitóticas, podendo cessar o desenvolvimento e até mesmo ocorrer escurecimento e morte do tecido vegetal. Já o B participa de complexos como manitol, ácido polimanurônico e outros constituintes das paredes celulares, estando envolvido no alongamento e na divisão celular. Sintomas de deficiência aparecem em regiões meristemáticas, promovendo acúmulo de compostos fenólicos, necrose de tecidos e dificultando a diferenciação e divisão celular (EPSTEIN; BLOOM, 2004; MALAVOLTA, 2006; TANAKA; FUJIWARA, 2008).

Considerando-se a importância dessas caracterizações estruturais ocasionadas por modificações nutricionais em meio de cultura, objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar as alterações morfológicas apresentadas por calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro* em dois períodos distintos de cultivo em função de concentrações de boro e cálcio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos explantes

Utilizaram-se sementes de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake fornecidas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), as quais foram catalogadas como T8A32, lote NA416 e coletadas da população base de Anhembi-SP. As sementes foram lavadas em água corrente por cinco vezes, sendo em seguida transferidas para álcool etílico 100% por três segundos. Posteriormente, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 70% (v/v) contendo Tween 20 (0,05% v/v), onde permaneceram sob agitação por 20 minutos. Em seguida, as sementes foram submetidas a três lavagens sequenciais em água deionizada e esterilizada, sendo posteriormente inoculadas em meio nutritivo N7 (Tabela 1) destinado à germinação.

2.2 Aplicação dos tratamentos

Os hipocótilos foram excisados na porção mediana com comprimento de 5 mm. Estes explantes foram mantidos por 21 dias em meio N7, o qual foi suplementado com 5 mg L⁻¹ de Picloram e 1 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, a fim de induzir a calogênese. Em seguida, foram cultivados, por dois períodos distintos, 21 e 31 dias, sendo os calos transferidos para meio de cultura N7 modificado em relação às concentrações de ácido bórico (H₃BO₃) e cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O), explicitados na Tabela 2.

Tabela 1 – Composição básica do meio de cultura utilizado para o cultivo *in vitro* de calos de *E. urophylla*.

Table 1 – Basic composition of a culture medium used for *in vitro* cultivation of *E. urophylla* calli.

Componente	Concentração
Macronutriente	(mg L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	463,0
KNO ₃	2.830,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	185,0
KH ₂ PO ₄	399,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	166,0
Micronutriente	(mg L ⁻¹)
FeSO ₄ .7H ₂ O	50,0
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	67,0
H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Vitaminas e aminoácidos	(mg L ⁻¹)
Ácido nicotínico	0,5
Tiamina-HCl	0,1
Piridoxina-HCl	0,5
Glicina	2,0
Fonte de carbono	(mg L ⁻¹)
Mio-inositol	100
Sacarose	20.000

Fonte: Simola (1985), modificado.

Source: Simola (1985), modified.

2.3 Preparo do meio de cultura

Os meios de cultura foram ajustados para pH de 5,8 com HCl ou NaOH (1 M ou 0,1 M), autoclavados à temperatura de 121 °C (≈ 1,0 kgf cm⁻²), durante 20 minutos, e distribuídos em placa de petri contendo 10 ml do meio de cultura. O meio de cultura foi suplementado com 6 g L⁻¹ de ágar.

2.4 Condições de cultivo

Os explantes foram cultivados, em sala de crescimento, com temperatura mantida a 25±2 °C, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 42 μmol m⁻² s⁻¹, a partir de lâmpadas fluorescentes branca-fria.

Tabela 2 – Tratamentos utilizados para o cultivo *in vitro* de calos de *E. urophylla*.**Table 2** – Treatments used for *in vitro* cultivation of *E. urophylla* calli.

Tempo		H ₃ BO ₃	CaCl ₂ .2H ₂ O
21 dias	31 dias	(μM)	(mM)
T1	T27	0	0,00
T2	T28	0	3,75
T3	T29	0	7,50
T4	T30	0	11,25
T5	T31	0	15,00
T6	T32	25	0,00
T7	T33	25	3,75
T8	T34	25	7,50
T9	T35	25	11,25
T10	T36	25	15,00
T11	T37	50	0,00
T12	T38	50	3,75
T13	T39	50	7,50
T14	T40	50	11,25
T15	T41	50	15,00
T16	T42	100	0,00
T17	T43	100	3,75
T18	T44	100	7,50
T19	T45	100	11,25
T20	T46	100	15,00
T21	T47	200	0,00
T22	T48	200	3,75
T23	T49	200	7,50
T24	T50	200	11,25
T25	T51	200	15,00
T26	T52	100*	1,13*

*meio de cultura N7 padrão (Tabela 1).

*standard N7 culture medium.

2.5 Avaliação das análises morfológicas

As análises morfológicas externas foram efetuadas aos 21 e aos 31 dias. Os calos foram analisados quanto ao tamanho, presença de raízes, friabilidade, aspecto gelatinoso, presença de estruturas globulares na superfície do calo e de pigmentos (antocianinas). A friabilidade e as diferenças organográficas foram avaliadas de forma visual,

à medida que se destacavam dentro de um tratamento específico.

2.6 Delineamento experimental

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (5x5), com parcelas subdivididas no tempo (21 e 31 dias), sendo os fatores constituídos por concentrações de H₃BO₃ e CaCl₂.2H₂O (Tabela 2). Para tanto, utilizaram-se cinco repetições contendo 20 calos, totalizando 100 calos. Os dados foram submetidos a análise de variância a 5% de probabilidade de erro.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Tamanho dos calos

Pela análise de variância correspondente ao tamanho médio de calo, constatou-se interação ($P < 0,05$) entre as concentrações de cálcio e boro com o tempo de cultivo *in vitro*. De maneira geral, os calos mensurados aos 21 dias de cultivo *in vitro* apresentaram maiores diferenças estruturais quando comparados aos calos mantidos por 31 dias em meio de cultura (Figura 1).

Foi possível constatar, através da análise dos resultados grafados na Figura 1, que o cultivo prolongado dos calos ocasionou uma redução dos processos de desenvolvimento. Após 21 dias de cultivo *in vitro* notou-se que os calos formados iniciaram um processo de oxidação, com conseqüente redução do crescimento e enraizamento, com mínima observação rizogênica aos 31 dias.

A exposição de materiais vegetais cultivados *in vitro*, por períodos determinados em meio de cultura pode interferir em seu desenvolvimento (LEITZKE et al., 2009), sendo que com a perda de água das células para o meio de cultura ou ainda, os processos de autólise caracterizariam efeito de proteção da planta em situação de estresse. O esgotamento mineral do meio de cultura pode ter induzido os calos a uma deficiência crônica de um ou mais nutrientes essenciais ao desenvolvimento e metabolismo celular, o que poderia ter retardado o processo de crescimento e desenvolvimento radicular.

Diversos fatores como o genótipo e o meio de cultura são relatados como responsáveis por afetar a morfogênese *in vitro* e o desenvolvimento das plantas (GEORGE, 1993; NEHRA et al., 2005). Borgatto et al. (2002) também verificaram influência do tempo de cultivo *in vitro* de *Chrysanthemum morifolium*, principalmente em meios com baixas concentrações de cálcio, o que afetou negativamente a calogênese e o crescimento dos calos.

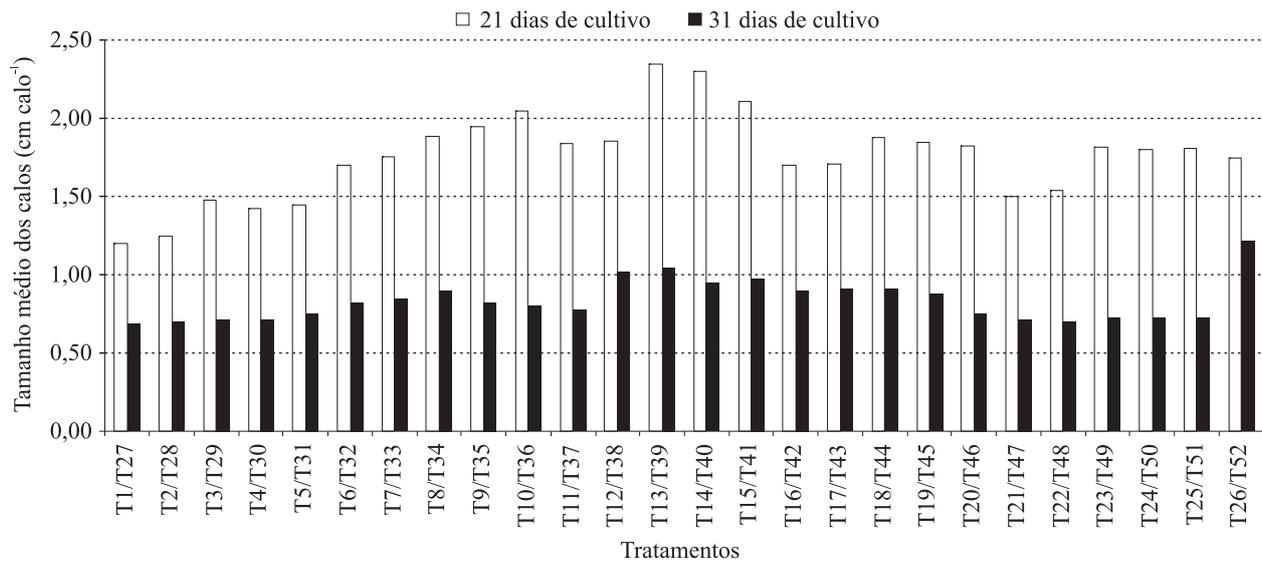


Figura 1 – Tamanho médio de calos de *E. urophylla* cultivados *in vitro* em meio N7 modificado com concentrações de boro e cálcio aos 21 e 31 dias.

Figure 1 – Average size of *E. urophylla* calli cultivated *in vitro* in a modified N7 medium with various boron and calcium concentrations at 21 and 31 days.

As análises referentes ao tamanho dos calos cultivados *in vitro* por 21 dias indicaram que a concentração com 50 μM de boro e 7,5 mM de cálcio foram as mais eficientes (T13), enquanto que, em períodos mais longos de cultivo (31 dias), destacou-se o meio padrão (T52).

O fato de culturas mais prolongadas se adaptarem melhor ao meio padrão (T52) pode ser devido à existência de uma disponibilidade nutricional satisfatória, capaz de manter o crescimento de calos desta espécie, mesmo em situações adversas de cultivo.

Independente da concentração de cálcio empregada, ao se utilizar 50 μM de boro no meio de cultura (T11, T12, T13, T14, T15, T37, T38, T39, T40 e T41), os calos responderam positivamente a estas concentrações (Figura 1), apresentando aumento no tamanho dos calos. Trevizam (2001), testando doses de boro em cultivos *in vitro* de *E. urophylla*, também relatou desenvolvimento regular dos calos nesta mesma concentração de boro, ou seja, 50 μM . Dessa forma, podemos inferir que diante das condições testadas, essa concentração poderia ser indicada como a mais eficiente no desenvolvimento das estruturas calogênicas.

Em ambos os períodos de cultivo, verificou-se que os calos cultivados em meio de cultura sem cálcio e boro (T1 e T27) apresentaram desenvolvimento reduzido das estruturas, quando comparados com tratamentos

em que se combinou a ausência do macronutriente com concentrações crescentes e diferentes de boro.

Esses efeitos podem denotar a interferência do micronutriente no crescimento vegetal e na sua capacidade de remediar as deficiências do cálcio. De acordo com Malavolta (2006), a quantidade e disponibilidade de um dos nutrientes (cálcio ou boro) podem interferir na distribuição e também no requerimento do outro nutriente para alcançar um índice de crescimento ótimo da planta, destacando a importância desses elementos para o crescimento das espécies.

3.2 Presença de raízes

Os calos apresentaram células de aspecto meristemático, porém arrançadas de forma distinta, sendo que, aos 31 dias de cultivo, essas estruturas mostraram-se organizadas em estratos com células alongadas, com núcleos aparentes e diferenciação de sistema vascular sem a formação convencional de raízes (Figura 2a-d).

Por meio das análises histológicas, verificou-se a indução de raízes com diferenciação de sistema vascular na maioria dos tratamentos (Figura 2a e 2b), excetuando-se em T1, T13 e T26 que não apresentaram o desenvolvimento do órgão. Já na avaliação de calos cultivados *in vitro* por 31 dias (Figura 2b), observaram-se raízes apenas em T30, T31, T35, T36, T45, T49, T50 e T51.

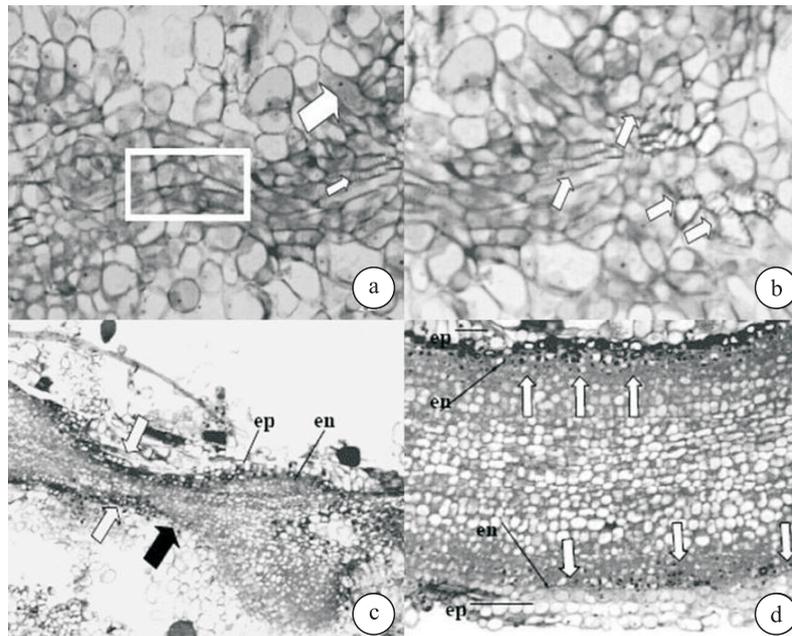


Figura 2 – Presença de raízes em calos de *E. urophylla* cultivados *in vitro* em meio N7 modificado com concentrações de boro e cálcio (T36) aos 31 dias. a) Detalhe: células com baixa relação núcleo citoplasmáticas com formas alongadas, evidenciando diferenciação de sistema fundamental; Seta maior: núcleos proeminentes com indicação de divisão celular; Seta menor: diferenciação e organização de sistema vascular. b) Setas: detalhe de elementos vasculares do xilema formados isoladamente e aleatoriamente nos calos. c) Corte longitudinal em raiz. Seta branca: raiz apresentando conformação desestruturada com células coradas na endoderme; Seta escura: ausência de células epidérmicas. d) Corte longitudinal em raiz. Setas: detalhe da região com espessamento de células indicando maior diferenciação. ep - epiderme, en - endoderme.

Figure 2 – Root presence in calli of *E. urophylla*, cultivated *in vitro* in a modified N7 medium with concentrations of boron and calcium (T36) at 31 days. a) Detailed area: cells with a low nucleus/cytoplasm ratio, with elongated forms, evidencing a differentiated ground system; Big arrow: prominent nuclei with indication of cell division; Small arrow: differentiation and organization of vascular system. b) Arrows: detailed vascular elements of xylem formed separately and randomly in calli. c) Lengthwise cut of root. White arrow: root presenting destructured conformation with colored cells in the endodermis; Dark arrow: absence of epidermal cells. d) Lengthwise cut of root. Arrows: detailed area with cell thickening indicating greater differentiation. ep - epidermis, en - endodermis.

Observou-se também que a conformação das células epidérmicas foi irregular e descontínua. Logo abaixo da epiderme, observou-se a presença da endoderme, a qual se caracterizou pela presença de células arredondadas contornando o cilindro vascular na maior parte da estrutura. Esse espessamento poderia indicar a formação de tecido de sustentação com fibras esclerenquimáticas (Figuras 2c e 2d).

Diante dos resultados obtidos, constatou-se que as limitações do meio de cultura foram determinantes para que os calos só respondessem à rizogênese, de forma mais eficiente, sob concentrações mais elevadas de cálcio, ou seja, em concentrações superiores a 7,5 mM. Em tratamentos com omissão total de boro e cálcio (T1 e T27), não se registrou a formação de raízes (Figura 3).

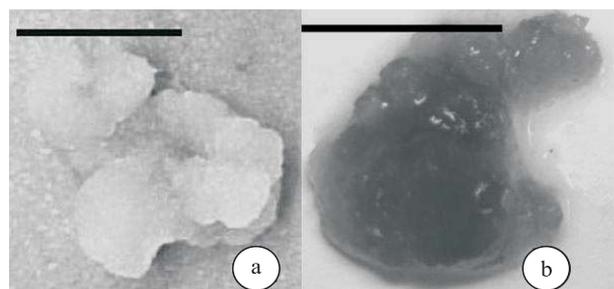


Figura 3 – Estruturas calogênicas *E. urophylla* com aspecto gelatinoso. a) Calo aos 21 dias (T1); b) Calo aos 31 dias (T27). Escala: 0,5 cm.

Figure 3 – Callus structures of *E. urophylla* with a viscous aspect. a) Callus at 21 days (T1); b) Callus at 31 days (T27). Scale: 0.5 cm.

O efeito da omissão de boro em raízes é conhecido e controverso. Recentemente, Villa et al. (2009) comprovaram que a adição de ácido bórico ao meio de cultura *in vitro* proporcionou maior número de folhas e comprimento de raízes do porta-enxerto de videira ‘Kobber’ (*Vitis* sp.).

A quantidade e a disponibilidade de cada um dos nutrientes podem afetar a distribuição e o requerimento do outro nutriente para que a planta expresse um índice de crescimento global (MALAVOLTA, 2006). Desta forma, pode-se supor que o B e Ca atuam de maneira sinérgica em processos organogênicos enquanto que as ausências conjuntas de ambos os nutrientes podem ter interferido na rizogênese *in vitro* de *E. urophylla*.

3.3 Aspecto gelatinoso

Foi verificada a ocorrência de calos com aspecto gelatinoso quando cultivados *in vitro* com concentrações distintas de boro e cálcio aos 21 e aos 31 dias (Figura 3a e 3b).

Observou-se que, independente das concentrações de cálcio utilizadas, os calos cultivados com omissão de boro apresentaram aspectos gelatinosos nos tratamentos T1, T2, T3, T4, T27, T28 e T29. Da mesma forma, o tratamento T21 (com omissão de cálcio e concentração tóxica de boro) mostrou a mesma desestruturação na conformação dos calos (Figura 3a e 3b).

Diversos autores confirmam a atuação do macro e do micronutriente na formação e na gênese da parede e da membrana celular (EPSTEIN; BLOOM, 2004; MALAVOLTA, 2006), fato que confirmaria a desestruturação das formações calogênicas quando estes nutrientes são omitidos ou apresentam concentrações inadequadas para o desenvolvimento dos calos. Trevizam (2005), ao estudar a interferência do boro e do cálcio em calos de *E. urophylla*, evidenciou interferência semelhante ao omitir estes nutrientes do meio de cultura, resultando em pronunciada desagregação celular.

3.4 Estruturas globulares e friabilidade

Evidenciou-se o aspecto de estruturas globulares na superfície de calos cultivados *in vitro* com concentrações distintas de boro e cálcio aos 21 e 31 dias (Figura 4a e 4b).

Aos 31 dias de cultivo, estruturas globulares foram visualizadas em quase todos os tratamentos, exceto em T32, T33, T37, T41, T45 ao T52. Ao passo que, aos 21 dias, estas estruturas apresentaram aspectos mais brilhantes e ocorreram apenas nos tratamentos T8, T9, T10, T13 e T14.

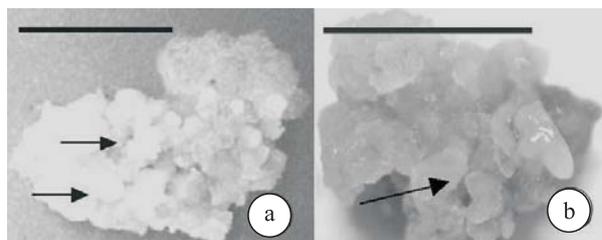


Figura 4 – Estruturas calogênicas de *E. urophylla* com aspecto globular. Setas: a) Calo aos 21 dias (T13); b) Calo aos 31 dias (T34). Escala: 0,5 cm.

Figure 4 – Callus structures of *E. urophylla* with a globular aspect. Arrows: a) Callus at 21 days (T13); b) Callus at 31 days (T34). Scale: 0.5 cm.

Da mesma forma que a presença de estruturas globulares, a friabilidade dos calos foi um aspecto comum nas culturas avaliadas aos 21 dias (T6, T7, T11, T16, T18, T24 e T25), enquanto que, para os cultivos de 31 dias, a formação de estruturas friáveis foi comprometida pela oxidação, apresentando-se apenas nos tratamentos: T28 ao T31, T38, T39, T41 e T46 (Figura 5a e 5b).

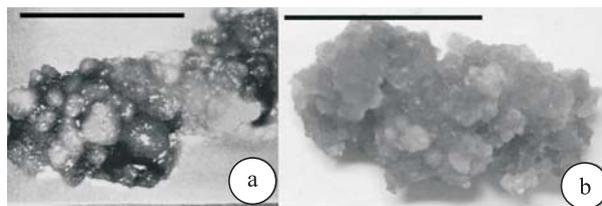


Figura 5 – Estruturas calogênicas de *E. urophylla* com aspecto friável. a) Calos aos 21 dias (T16); b) Calos aos 31 dias (T31). Escala: 0,5 cm.

Figure 5 – Callus structures of *E. urophylla* with a friable aspect. a) Callus at 21 days (T16); b) Callus at 31 days (T31). Scale: 0.5 cm.

As formas globulares associadas à superfície dos calos podem caracterizar a presença de organogênese e/ou embriogênese somática. Contudo, essas afirmações apenas podem ser comprovadas através de análises da morfologia interna (TREVIZAM, 2005).

Muitos são os fatores que influenciam o comportamento do explante no meio de cultura, incluindo o órgão que serve como fonte de tecido, a idade fisiológica e ontogenética do órgão, o tamanho do explante e, acima de tudo, a qualidade da planta doadora (GEORGE, 1993).

3.5 Presença de pigmentos

De acordo com os dados da morfologia externa apresentados na Figura 6, verificou-se a presença de dois pigmentos distintos nos calos de *E. urophylla*, sendo um caracterizado pela cor marrom, definida pela oxidação fenólica e outro com coloração vermelha em consequência da presença de antocianina.

A oxidação (coloração marrom) mostrou relação com a redução do desenvolvimento das estruturas cultivadas por 21 dias nos tratamentos T1 ao T9 e T17 ao T25. No período de análise posterior (31 dias), a oxidação dos calos foi bastante evidenciada em todos os tratamentos, porém no T51 a oxidação causou os maiores danos aos calos (Figura 6a).

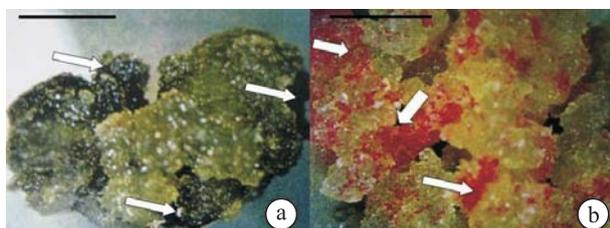


Figura 6 – Presença de pigmentos em calos de *E. urophylla* cultivados *in vitro* com concentrações distintas de boro e cálcio. Setas: a) Presença de oxidação aos 31 dias (T51); b) Presença de antocianinas em calos aos 31 dias (T51). Escala: 0,5 cm.

Figure 6 – Presence of pigments in *E. urophylla* calli cultivated *in vitro* with various concentrations of boron and calcium. Arrows: a) Presence of oxidation at 31 days (T51); b) Presence of anthocyanins in calli at 31 days (T51). Scale: 0.5 cm.

Independentemente das concentrações de cálcio empregadas, o meio de cultura com 50 μ M de boro aos 21 dias foi o único a não caracterizar o surgimento do pigmento marrom. Em muitos casos, a deficiência de boro associa-se ao escurecimento de tecidos foliares, sendo este escurecimento consequência provável de acúmulo de fenóis e da atividade da polifenol-oxidase (PPO) de acordo com Cakmak et al. (1995). As quinonas produzidas pela PPO são polimerizadas e geram pigmentos marrons, em que o acúmulo de quantidades substanciais de quinonas em espécies de plantas sensíveis a deficiência de boro tem sido considerado como a maior causa de danos e suspensão do crescimento celular em diversas espécies vegetais (LEE; ARONOFF, 1967). Dessa forma, a produção de fenóis apresenta-se como uma resposta ao desequilíbrio do meio de cultura sendo que o cálcio, isoladamente, não remedia esse acúmulo nas células.

Diferentemente da coloração marrom, os tons de vermelho estão relacionados a promoção do desenvolvimento em tamanho dos calos (Figura 6b). Dessa forma, o tratamento T13 apresentou calos com coloração vermelha marcante e, ao mesmo tempo, apresentou os maiores tamanhos médios. Outros tratamentos também apresentaram o pigmento (T1, T5, T7, T10, T11, T14, T15, T17, T19 e T23), no entanto, a intensidade da coloração foi inferior à do tratamento T13. Em calos cultivados por 31 dias, a antocianina foi visualizada somente em T40 (Figura 6b).

A cultura *in vitro* de células de plantas pode acumular grande variedade de metabólitos secundários como polifenóis, alcalóides, esteróides e antocianinas, que tendem a se perder em períodos prolongados de cultivo (GEORGE, 1993; NEHRA et al., 2005). A presença de antocianinas já foi relatada na organogênese (SUBBAIAH; MINOCHA, 1990) e na embriogênese somática (ARRUDA et al., 2000; TREVIZAM, 2001) de *Eucalyptus*, o que está de acordo com o observado no presente trabalho.

4 CONCLUSÕES

As concentrações distintas de boro e cálcio e o tempo de cultivo interferiram no tamanho e na morfologia externa dos calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro*.

Concentrações mais elevadas de cálcio promoveram a indução de raízes nos calos.

A omissão simultânea de B e Ca inibiu a rizogênese, causou a desestruturação dos calos, e favoreceu a formação de estruturas globulares e friáveis, com a ocorrência de pigmentos característicos como antocianina.

5 AGRADECIMENTOS

À FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- ARRUDA, S. C. C.; SOUZA, G. M.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. **Plant Cell, Organ and Tissue Culture**, Netherlands, v. 63, n. 2, p. 142-154, 2000.
- BORGATTO, F.; DIAS, C. T. S.; AMARAL, A. F. C.; MELO, M. Calcium, potassium and magnesium treatment of *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” and callogenesis *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 4, p. 689-693, 2002.

- CAKMAK, I.; KURZ, H.; MARSCHNER, H. Short-term effects of boron germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 59, p. 11-18, 1995.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Planta, 2004. 403 p.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. v. 1, 574 p.
- GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. 'Urrbrae Gem'. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Berlin, v. 42, n. 2, p. 139-143, 2006.
- GUNTER, E. A.; POPEYKO, O. V.; OVODOV, Y. U. Modification of polysaccharides from callus culture of *Silene vulgaris* (M.) G. using carbohydrases *in vitro*. **Biochemistry**, Moscow, v. 72, n. 9, p. 1008-1015, 2007.
- HAJARI, E.; WATT, M. P.; MYCOCK, D. J.; McALISTER, B. Plant regeneration from induced callus of improved *Eucalyptus* clones. **South African Journal of Botany**, Grahamstown, v. 72, n. 2, p. 195-201, 2006.
- LEE, S.; ARONOFF, S. Boron in plants: a biochemical role. **Science**, Washington, n. 158, p. 798-799, 1967.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboesa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. v. 1, 638 p.
- MUSSIO, I.; RUSIG, A. M. Morphogenetic responses from protoplasts and tissue culture of *Laminaria digitata* (Linnaeus) J. V. Lamouroux (Laminariales, Phaeophyta): callus and thalloid-like structures regeneration. **Journal of Applied Phycology**, Netherlands, v. 21, n. 2, p. 255-264, 2009.
- NEHRA, N. S.; BECWAR, M. R.; ROTTMANN, W. H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H. D.; KODRZYCKI, R. J.; ZHANG, C.; GAUSE, K. C.; PARKS, D. W.; HINCHEE, M. A. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Berlin, v. 41, n. 6, p. 701-717, 2005.
- SIMOLA, L. K. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula* F. purpurea. **Scientia Horticulturae**, Maryland Heights, v. 26, p. 77-85, 1985.
- 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.
- TANAKA, M.; FUJIWARA, T. Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, Berlin, v. 456, n. 4, p. 671-677, 2008.
- TREVIZAM, R. **Análises histológicas e bioquímicas em calos de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake cultivados *in vitro* sob interação nutricional de boro e cálcio**. 2005. 150 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.
- TREVIZAM, R. **Atuação de concentrações de boro na morfogênese de *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro***. 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2001.
- VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A.; ASSIS, G. A.; ZÁRRAGA, D. Z. A. Micropropagação de duas espécies frutíferas, em meio de cultura DSD1, modificado com fontes de boro e zinco. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 468-472, mar./abr. 2009.