



**THAÍS TEIXEIRA VALÉRIO CAETANO**

**INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DE  
CALOS E SUSPENSÃO CELULAR DE EUCALIPTO**

**LAVRAS - MG  
2021**

**THAÍS TEIXEIRA VALÉRIO CAETANO**

**INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DE CALOS E  
SUSPENSÃO CELULAR DE EUCALIPTO**

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

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Orientador

Dra. Rafaeli Aparecida Vieira de Souza

Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Caetano, Thaís Teixeira Valério.

Indução e caracterização morfoanatômica de calos e suspensão  
celular de Eucalipto / Thaís Teixeira Valério Caetano. - 2021.

92 p. : il.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Coorientador(a): Rafaeli Aparecida Vieira de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Embriogênese somática. 2. indução de calos. 3. suspensão  
celular. I. Paiva, Luciano Vilela. II. de Souza, Rafaeli Aparecida  
Vieira. III. Título.

**THAÍS TEIXEIRA VALÉRIO CAETANO**

**INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DE CALOS E  
SUSPENSÃO CELULAR DE EUCALIPTO**

**INDUCTION AND MORPHOANATOMIC CHARACTERIZATION OF CALLUS  
AND CELL SUSPENSION OF EUCALYPTUS**

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

APROVADA em 31 de agosto de 2021

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva, UFLA

Dra. Vanessa Cristina Stein, UFSJ

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Orientador

Dra. Rafaeli Aparecida Vieira de Souza

Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2021**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À minha mãe Jaqueline, e meu pai Geraldo, que sempre acreditaram em meus estudos e fizeram o possível para que eu conseguisse vir para Lavras fazer o mestrado. Às minhas tias Maria, Rita e Judite que nunca deixaram de acreditar em meu potencial, e me apoiam, desde sempre, mesmo que de longe. Ao meu irmão Daniel, que se fez presente nos momentos que mais precisei, e por sempre tentar ajudar como pode.

Ao meu orientador, prof. Luciano, que me acolheu como aluna de pós-graduação em seu laboratório. À minha co-orientadora, Rafaeli, que me acompanhou em todas as etapas durante meus dois anos de mestrado, que me aconselhou e me ensinou, e me acolheu de todas as formas possíveis. Muito obrigada pelo apoio e paciência, sem você não teria conseguido! A todos do Laboratório Central de Biologia Molecular, Heliete, Ricardo, Fabrício, Rô, Renan, Wesley, e Tati, obrigada pelas conversas na hora do café, pelos jogos de xadrez no meio da tarde, pelas conversas jogadas fora, obrigada por me acolherem.

Aos meus amigos que a graduação me deu, Camila Amaro, Jéssica, Sara, Lucas, Camila Moreno e Bruna, obrigada por estarem presente em mais uma etapa da minha vida. Mesmo de longe todo o apoio de vocês fez muita diferença. Não conseguiria sem vocês. Aos meus amigos que Lavras me deu, Lívia, Ananda e Otávio, obrigada por serem meu porto seguro, por terem me acolhido e serem a família que eu escolhi. Aos meus amigos de Divinópolis, Letícia e Matheus, por todos esses anos de amizade, e sempre acreditando em mim e sendo meu respiro nos momentos difíceis. Aos meus amigos e companheiros da fisiologia vegetal, Dani, Victor, Mateus, Lud, Letícia, Ana, Geovane, Josy, Marina e Alex, obrigada por compartilharem sorrisos e lágrimas, por todos os encontros na cozinha da fisiologia, pelas horas de conversa e conselhos e por serem apoio nessa loucura que foi esses dois últimos anos.

Todo meu agradecimento e gratidão à Universidade Federal de Lavras e ao setor de Fisiologia Vegetal, onde pude realizar meu trabalho e concluir essa etapa dos meus estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos, absolutamente, todos que de alguma forma me fortaleceram nessa jornada! Eu sou eternamente grata a todos vocês!!!

## RESUMO

Eucalipto é uma planta lenhosa de grande aplicabilidade nas indústrias madeireira, de celulose e papel e até mesmo na indústria farmacêutica com produção de óleos essenciais. Porém, o eucalipto possui um alto nível de heterozigosidade, que dificulta os processos de melhoramento convencional. Embora a transformação genética de plantas seja uma tecnologia em potencial para auxiliar as técnicas convencionais de melhoramento genético, para espécies perenes, esta tecnologia continua difícil de ser adotada devido à ausência de um sistema efetivo de regeneração de plantas transformadas. Tendo isso em vista, uma das estratégias em potencial utilizadas da cultura de tecidos é a embriogênese somática que somada ao cultivo de suspensão celular, pode trazer benefícios quando aplicada à cultura de espécies lenhosas, como o eucalipto. Esta estratégia traz vantagens como a propagação clonal em massa em curto período e facilidade na obtenção de cultivares com as qualidades de interesse desejadas. Contudo, uma das dificuldades enfrentadas para espécies recalcitrantes como o eucalipto é a baixa eficiência de indução de calos embriogênicos e/ou a baixa frequência de germinação dos embriões, tornando sua aplicação limitada. Por isso, o objetivo desse trabalho foi testar meios de cultivo MS e MS modificado com redução de 50% da concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , com a adição de citocininas (BAP, KN e 2-iP) bem como os meios básicos de cultivo N6, MS e JADS, com adição de picloram (0, 100, 200, 400 e 800  $\mu\text{M}$ ) na indução de calos embriogênicos e obter um protocolo eficiente mediante o uso de suspensão celular de eucalipto e regeneração dos respectivos embriões somáticos. Os resultados mostraram que a redução de nitrato de amônio do meio de cultivo não pareceu favorecer a indução de formação de calos em *E. grandis*. A utilização de 2-iP ajudou na formação de calos amarelos semi-friáveis e a utilização de BAP favoreceu a formação de calos amarelos compactos. Os calos oriundos de hipocótilo e folha cultivados em meio N6 e JADS têm potencial para obtenção da embriogênese somática.

**Palavras-chave:** Eucalipto; embriogênese somática; citocininas; picloram; calogênese

## ABSTRACT

Eucalyptus is a woody plant with major applicability in the timber, cellulose and paper industries and even in the pharmaceutical industry with the production of essential oils. However, eucalyptus has a high level of heterozygosity, which hinders the conventional breeding processes. Although the genetic transformation of plants is a potential technology to assist conventional techniques of genetic improvement, for perennial species, this methodology remains difficult to be adopted due to the absence of an effective regeneration system for transformed plants. In this context, one of the potential strategies used in tissue culture is somatic embryogenesis, which added to the cultivation of cell suspension, can bring benefits when applied to the culture of woody species, which includes eucalyptus. This approach brings advantages, as for instance, mass clonal propagation in a short period of time and also assist in obtaining cultivars with qualities of interest. Nevertheless, one of the difficulties faced by recalcitrant species such as eucalyptus is the low efficiency of inducing callogenesis and the low frequency of germination of embryos, making its application limited. Therefore, the goal of this work was to test the culture media MS and modified MS with its  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  reduced up to 50% of its concentration, adding cytokinins (BAP, KN and 2-iP) to the culture. N6, MS and JADS media were also tested with the addition of picloram (0, 100, 200, 400 and 800  $\mu\text{M}$ ) in order to induce embryogenic calluses and to obtain an efficient protocol for eucalyptus cell suspension and regeneration of the respective somatic embryos. The results showed that the reduction of ammonium nitrate in the culture medium did not seem to favor the induction of callus formation in *E. grandis*. The use of 2-iP helped in the formation of semi-friable yellow calluses, and the use of BAP favored the formation of compact yellow calluses. Calli originated from hypocotyl and leaf, that were cultivated in N6 and JADS medium showed potential for obtaining somatic embryogenesis.

**Keywords:** Eucalyptus; somatic embryogenesis; cytokinins; picloram; callogenesis

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 Descrição da espécie e importância econômica .....	11
2.2 Embriogênese somática do Eucalipto.....	12
2.2.1 Meio de indução .....	14
2.3 Regeneração dos embriões .....	16
2.4 Suspensão Celular .....	17
REFERÊNCIAS .....	19
CAPÍTULO 1 .....	22
INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM <i>Eucalyptus grandis</i> .....	22
MEDIANTE CITOCININAS E REDUÇÃO DE NITRATO DE AMÔNIO .....	22
RESUMO .....	23
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1 Desinfestação e germinação das sementes .....	25
2.2 Indução da calogênese .....	25
2.3 Análise histológica .....	27
2.4 Análise estatística .....	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
3.1 Indução de calos em cotilédones com 15 dias .....	28
3.2 Indução de calos em cotilédones com 30 dias .....	29
3.3 Indução de calos em hipocótilos com 30 dias .....	30
3.4 Análise histológica .....	32
4 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS .....	35
CAPÍTULO 2 .....	37
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA DE CALOS DE <i>Eucalyptus grandis</i> OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES MEIOS, EXPLANTES E DOSES DE PICLORAM .....	37
RESUMO .....	38
1 INTRODUÇÃO.....	39
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
2.1 Teste 1 .....	40

2.1.1 Desinfestação e germinação de sementes .....	40
2.1.2 Indução da calogênese .....	40
2.1.3 Análise histológica .....	41
2.1.4 Análise estatística .....	42
2.2 Teste 2 .....	42
2.2.1 Desinfestação e germinação das sementes .....	42
2.2.2 Indução de calos .....	43
2.2.3 Análise estatística .....	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
3.1 Teste 1 .....	44
3.1.1 Explante folha.....	47
3.1.2 Explante hipocótilo.....	50
3.1.3 Multiplicação e regeneração.....	52
3.1.4 Análise histológica .....	53
3.2 Teste 2 .....	60
3.3 Características morfológicas <i>versus</i> análises histológicas de calos de <i>E. grandis</i> .....	61
4 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS .....	64
CAPÍTULO 3 .....	67
MEIO N6 NA INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E SUSPENSÃO CELULAR DE <i>E. urograndis</i> .....	67
RESUMO .....	68
1 INTRODUÇÃO.....	69
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
2.1 Obtenção e multiplicação dos calos embriogênicos .....	70
2.2 Suspensão celular .....	70
2.2.1 Análises histoquímicas .....	71
2.3 Regeneração dos calos em meio semissólido .....	72
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	73
3.1 Obtenção de calos embriogênicos .....	73
3.2 Suspensão celular de <i>E. urograndis</i> .....	75
3.3 Análise histológica e teste de dupla coloração da suspensão celular de <i>E. urograndis</i> .....	77
3.4 Regeneração e Maturação.....	78
3.4.1 Suspensões celulares.....	78
3.4.2 Calos embriogênicos .....	79

4 CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS .....	85
APÊNDICE .....	90

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A embriogênese somática é um processo assexual no qual as células haploides ou somáticas se desenvolvem e seguem os estágios característicos do desenvolvimento dos embriões zigóticos, produzindo descendentes sem a fusão de gametas (SILVA et al., 2017). É uma técnica que foi desenvolvida com o objetivo de aprimorar a multiplicação e propagação de plantas *in vitro*. Nesse sentido, avanços nas áreas de cultura de tecidos visam proporcionar a embriogênese somática, não apenas como uma pesquisa básica, mas também com aplicação em escala comercial. Hoje em dia, essa técnica está sendo usada tanto para a produção homogênea e em grande escala de mudas clonais de espécies lenhosas, como também como aplicação na silvicultura como meio de melhoramento florestal (KENDURKAR & RANGASWAMY, 2018).

O eucalipto é um dos gêneros mais importantes comercialmente de árvores plantadas para produção de madeira, papel, celulose e até mesmo óleos essenciais e, é responsável, por 1,3% do PIB bruto nacional e 6,9% do PIB industrial (Relatório Anual da Indústria Brasileira de Árvores, 2020). As técnicas de melhoramento genético convencional para obtenção de melhores linhagens de eucalipto, constituem processo difícil e demorado, pois o eucalipto possui alto nível de heterozigosidade. As técnicas biotecnológicas podem contribuir para uma maior celeridade no melhoramento convencional, no entanto, para algumas espécies, a falta de um sistema efetivo de regeneração de plantas faz com que esta tecnologia se torne custosa e demorada.

A embriogênese somática, tem o potencial de suprir as necessidades que a engenharia genética demanda, trazendo benefícios quando aplicada à cultura de espécies lenhosas, proporcionando vantagens como a propagação clonal em massa em curto período de tempo e maior facilidade de obtenção de cultivares com qualidades de interesse (MONTEIRO, 2013; TORRES, 2014).

Contudo, baixos níveis de potencial embriogênico foram observados em espécies de eucalipto (TORRES et al., 1993; PAIS, 2019) apresentando recalcitrância à embriogênese somática e dificultando sua eficiência na obtenção de embriões somáticos. Esse fator negativo dos embriões somáticos de eucalipto não conseguirem atingir a maturidade completa e germinar, e, também, devido à possibilidade de ocorrência de variação somaclonal têm se tornado limitante para o uso dessa técnica no âmbito comercial (CORREDOIRA et al., 2019; MOURA et al., 2019). Apesar disso, a embriogênese somática possui potencial para viabilizar

protocolos de transformação genética eficientes, já que a regeneração de plantas a partir de tecidos transformados via organogênese pode frequentemente dar origem à produção de quimeras, enquanto a regeneração via embriogênese somática pode oferecer a vantagem de uma única origem celular que reduz esse problema (CORREDOIRA et al., 2015).

Atualmente não há nenhum protocolo eficaz para a embriogênese somática do *Eucalyptus* que seja utilizado comercialmente. Como a embriogênese somática é genótipo-dependente, as buscas por um protocolo eficiente ainda são feitas a partir de tentativa e erro, e por isso as condições ideais para a indução da embriogênese somática são únicas para cada espécie (CORREDOIRA et al., 2019). Sendo assim, nesse trabalho o foco foi: i) avaliar o uso de diferentes citocininas, idade de explantes e bem como o efeito do nitrato de amônio na indução de calos embriogênicos de *E. grandis*; ii) avaliar diferentes meios de cultivo e doses de Picloram na indução de calos embriogênicos de *E. grandis* e *E. urograndis*; iii) obtenção de um protocolo eficiente de suspensão celular e regeneração dos embriões somáticos.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Descrição da espécie e importância econômica**

Eucalipto é uma planta lenhosa, originada da Austrália (GIRIJASHANKAR, 2011), que pode ser encontrado em mais de 90 países, sendo as maiores plantações presentes no Brasil, Índia e China. Pertencente à família *Myrtaceae*, possui 894 espécies, incluindo subespécies e híbridos (CORREDOIRA, 2018). Os Eucaliptos são conhecidos por sua alta taxa de crescimento e grande produção de biomassa.

Esse gênero, por ter propriedades físicas e químicas diversas, também consegue se desenvolver em uma ampla variedade de ambientes, e por isso fazem com que os eucaliptos sejam utilizados para as mais diversas finalidades na indústria madeireira, de papéis e celulose, produção de óleos essenciais, carvão vegetal, chapas de fibras, geração de energia e até medicamentos (GIRIJASHANKAR, 2011). Essa gama de propriedades também faz com que esse gênero seja utilizado para suprir as demandas mundiais de plantas lenhosas, podendo prevenir o desflorestamento de florestas naturais (KENDURKAR & RANGASWAMY, 2018).

Esse gênero é responsável por aproximadamente 1,3% do PIB bruto nacional e 6,9% do PIB industrial, gerando uma receita de aproximadamente 6 bilhões por ano. Atualmente, estima-se que há aproximadamente 6,97 milhões de hectares de florestas plantadas de eucalipto no Brasil que representam 77% de área plantada do território nacional, e são responsáveis por mais de 90% de toda a madeira utilizada para fins produtivos, segundo o Relatório Anual da Indústria Brasileira de Árvores de 2020.

Atualmente, técnicas biotecnológicas como a micropropagação *in vitro*, clonagem e outras técnicas da cultura de tecido têm sido utilizadas para a produção de linhagens melhoradas de eucalipto. Para as espécies de eucalipto, as técnicas de melhoramento genético convencional constituem um procedimento difícil e demorado, principalmente devido ao alto nível de heterozigosidade. Embora a transformação genética de plantas apresente um alto potencial, esta estratégia continua difícil para a maioria das espécies perenes, devido à ausência de um sistema efetivo de regeneração de plantas transformadas. Uma das técnicas da cultura de tecidos com maior potencial para este fim é a embriogênese somática, permitindo para várias espécies a propagação clonal em massa em curto período. Entretanto, o eucalipto apresenta recalcitrância à embriogênese somática, levando a baixa eficiência de indução e baixa frequência de germinação de embriões, tornando a sua aplicação limitada (GRANJA, 2014; CORREDOIRA et al., 2015).

## 2.2 Embriogênese somática do Eucalipto

A embriogênese somática é o processo em que uma célula somática se desdiferencia em uma célula embriogênica totipotente que tem capacidade de gerar um embrião *in vitro* (GUAN et al., 2016). A embriogênese pode seguir dois caminhos de desenvolvimento distintos *in vitro*: o modelo direto, no qual os embriões somáticos surgem diretamente nos tecidos dos explantes, e o modelo indireto, no qual a formação dos embriões passam por uma fase intermediária de células desdiferenciadas, chamadas de calos embriogênicos (MONTEIRO, 2013; ABIRI et al., 2020).

Pesquisas com diversas espécies de eucalipto vêm sendo feitas usando diferentes tipos de explantes, diferentes condições fisiológicas da planta-mãe, diferentes tipos de combinação de auxinas e diferentes meios de cultura. Para a maioria dessas espécies, os resultados foram insatisfatórios, principalmente pela falta de um protocolo eficiente e passível de reprodução para serem usados tanto em pesquisas básicas, como também em escala comercial. Os resultados esperados da embriogênese somática também podem ser afetados pela ocorrência

de variação somaclonal, baixa eficácia para iniciação da competência embriogênica e incapacidade de os embriões somáticos atingirem a maturação completa (PAIS, 2019; ABIRI, et al., 2020). Apesar da baixa frequência de germinação de embriões somáticos em espécies de eucalipto, a embriogênese somática é o procedimento ideal para protocolos de transformação, uma vez que a regeneração de plantas a partir de tecidos transformados via organogênese pode frequentemente dar origem à produção de quimeras, enquanto a regeneração via embriogênese somática pode oferecer a vantagem de uma origem celular única (CORREDOIRA et al., 2015). Além disso a embriogênese somática possui vantagens sobre outros tipos de técnicas de propagação por possuir altas taxas de multiplicação do material e possibilidade de cultivo em meio líquido dentro de biorreatores (CORREDOIRA et al., 2019).

Em algumas espécies de plantas não-lenhosas, a oxidação do calo dificulta o início do processo embriogênico podendo causar a morte do explante. Porém, nas espécies lenhosas, como o eucalipto, a oxidação do calo é um processo que pode anteceder a formação do embrião. A oxidação dos tecidos ocorre, normalmente, em resposta à uma situação de estresse, que em baixos níveis pode causar mudanças na fisiologia e no metabolismo das células vegetais, induzindo mecanismos de adaptação como processos de cicatrização, organogênese e embriogênese somática (MOURA et al., 2019).

A competência embriogênica de células somáticas cultivadas *in vitro* pode ser estimulada por vários fatores, como altos níveis de auxina, pressão osmótica, pH, temperatura ou ferimento mecânico de explantes. A embriogênese somática pode ser induzida em culturas de vários tipos de explantes como pecíolos, folhas, raízes, filamento de antera, meristemas caulinares, sementes, cotilédones, hipocótilo, segmento nodal e embriões zigóticos imaturos e maduros. Embora o tecido vegetal maduro seja desejável como fonte de explante, na maioria dos experimentos de indução de embriogênese somática em eucalipto, o material juvenil tem tido melhores respostas, por serem ricos em tecido meristemático. Além disso, o efeito do genótipo tem sido considerado um fator crucial na indução de embriogênese somática em eucaliptos (GUAN et al., 2016; KENDURKAR & RANGASWAMY, 2018; MOURA et al., 2017; GRANJA et al, 2018).

É necessário salientar que a seleção do estágio específico de desenvolvimento do explante, as transferências sequenciais e as condições apropriadas de cultivo, como meio de cultura, temperatura e luz são importantes para o sucesso do protocolo, especialmente para a aquisição de competência embriogênica. Já para a multiplicação das culturas embriogênicas,

geralmente há uma redução nos níveis dos reguladores de crescimento do meio de cultura. Essa redução permite ciclos repetitivos de divisão celular e o controle dos processos de diferenciação. É geralmente nessa fase que suspensões celulares são estabelecidas (MONTEIRO, 2013).

### **2.2.1 Meio de indução**

A cultura de tecidos vegetais parte do princípio da totipotência, onde as células vegetais são capazes de se desdiferenciar e se regenerar em uma planta completa em meio nutritivo apropriado e em condições assépticas (TEIXEIRA, 1983; PAIS, 2019). Além do tipo de explante utilizado, os meios de cultivo onde estes serão cultivados são os fatores mais frequentemente decisivos para o sucesso do cultivo de tecidos vegetais (PASQUAL; HOFFMANN; RAMOS, 2001).

O objetivo principal do meio de indução é fazer com que as células somáticas do explante inicial adquiram a competência embriogênica (CORREDOIRA et al., 2019). Existe, porém, uma dificuldade em atender as demandas de cada espécie com um único meio de cultura e, portanto, muitas vezes são utilizados reguladores de crescimento e modificações de meios já existentes ou meios inerentes a determinadas espécies vegetais. O crescimento e desenvolvimento dos explantes e das plantas como um todo, podem então, ser modificados pela adição de reguladores de crescimento (fitohormônios naturais ou versões sintéticas) em diferentes etapas do desenvolvimento ou maturação (PHILLIPS & GARDA, 2019).

Estudos sistemáticos em espécies lenhosas, testando diferentes meios de cultura para a seleção do meio mais apropriado para uma determinada espécie são escassos. O meio de cultura mais utilizado para a indução de embriogênese somática em espécies lenhosas é o meio Murashige & Skoog conhecido como MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e suas modificações, como o MS de meia força ( $\frac{1}{2}$  MS). Os meios de cultura geralmente são compostos por macro e micronutrientes em diferentes proporções, vitaminas, aminoácidos, fontes de carbono (sacarose, maltose, glicose etc.) e reguladores de crescimento e um agente solidificante como o ágar ou Phytigel (MONTEIRO, 2013; CORREDOIRA et al., 2019).

O meio MS foi criado originalmente para a cultura de tabaco, mas é amplamente utilizado tanto para as dicotiledôneas assim como para as monocotiledôneas, e produz um bom meio de regeneração das plantas, devido aos altos níveis de nitrogênio nas formas de nitrato e amônio (PHILLIPS & GARDA, 2019).

O meio N6 (CHU et al., 1975) foi originalmente desenvolvido para cultura *in vitro* de arroz (*Oryza sativa L.*), sua composição com baixas concentrações de sulfato de amônio e nitrato de potássio como principal fonte de nitrogênio ajuda na iniciação e diferenciação de calos.

O meio JADS (CORREIA et al., 1995) foi proposto para propagação *in vitro* de *Eucalyptus* sp., mas também é utilizado para propagação de outras culturas lenhosas como a *Myrciaria aureana*. O meio JADS possui maiores concentrações de Fósforo (P), Magnésio (Mg) e Cobre (Cu) e menores concentrações de Enxofre (S), Zinco (Zn), Manganês (Mn) e Boro (B) quando comparado com o meio MS (FARIA et al., 2019). Mas a diferença mais significativa entre os meios JADS e MS é a quantidade de Cálcio (Ca) que é quase dez vezes maior no meio JADS. No meio MS a fonte de Ca é o cloreto de cálcio, já no meio JADS é o nitrato de cálcio. Diferentes fontes do mesmo nutriente podem gerar diferentes respostas na célula vegetal devido à sua formulação química, que pode influenciar em sua absorção e em sua translocação no tecido vegetal (MOURA et al., 2019).

Na maioria das espécies, a alta concentração de auxina, parece ter uma capacidade quase única de estimular a embriogênese somática em muitas espécies de plantas. O tipo e a concentração de auxina exógena também são fatores que influenciam na indução da embriogênese somática e são altamente variáveis entre as espécies. O Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) vem sendo eficaz na indução da embriogênese somática em espécies de cevada, tulipa, pupunha, macaúba e também na espécie híbrida de eucalipto, o *Eucalyptus urograndis* (MOURA et al., 2017).

Normalmente, a indução de embriogênese somática pela alta concentração de auxina é seguida pela sua diminuição em um gradiente de concentração até sua completa ausência (MONTEIRO, 2013; CORREDOIRA et al., 2019) e concomitantemente, aplica-se um outro regulador de crescimento no meio de cultura, como citocininas, que são responsáveis pela formação do eixo embrionário e o meristema bipolar, ou poliaminas que estão associadas com a divisão celular e tolerância ao estresse, fazendo com que ocorra desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos (CARVALHO, 2009; MOURA et al., 2019).

Além disso, a utilização de auxinas pode ser acompanhada por combinações de citocininas, que em conjunto, podem ser fatores chaves na determinação da competência embriogênica, provavelmente por fazerem parte da regulação do ciclo e da divisão celular (CARVALHO, 2006). As citocininas mais utilizadas na indução da embriogênese somática são: 6-benzilaminopurina (BAP), Cinetina (KN), Zeatina (Z) e 2-isopenteniladenina (2-iP). O

papel das citocininas na indução da embriogênese somática ainda não foi completamente elucidado por serem componentes, por vezes, facultativos no meio de indução e são utilizadas em baixas concentrações (CORREDOIRA et al., 2019). A utilização de citocininas, como o 2-IP e BAP, em combinação com Picloram já foram relatados na embriogênese somática de *Acrocomia aculeata* (MOURA, 2007; GRANJA, 2014), e para o híbrido *Eucalyptus urograndis* (MOURA et al., 2019).

Na embriogênese somática, o efeito de poliaminas, principalmente a putrescina, tem sido descrita e estudada em diversas espécies. Poliaminas são moléculas pequenas, alifáticas, de baixo peso molecular que possuem três grupamentos amino policatiônicos capazes de interagir eletrostaticamente com ácidos nucleicos, fosfolipídios e proteínas da parede celular. As principais poliaminas encontradas em plantas são a Putrescina, Cadaverina, Espermidina e Espermina. que estão associadas com a regulação de processos fisiológicos durante a divisão celular, síntese de proteínas, replicação do DNA e respostas à estresse, atuando em processos como organogênese, embriogênese, florescência, senescência e maturação de frutos (MOURA et al., 2019).

Além de poliaminas, é comum utilizar-se de outros suplementos no meio de cultura para ajudar no aumento da eficiência da indução da embriogênese somática, como alguns aminoácidos (Prolina) ou complexos de aminoácidos (caseína hidrolisada e extrato de malte) fornecendo uma fonte alternativa de nitrogênio. Outro componente bastante utilizado no meio de cultura é o nitrato de prata que controla os efeitos deletérios do etileno no tecido vegetal (CORREDOIRA et al., 2019).

### **2.3 Regeneração dos embriões**

A regeneração das plantas é um processo limitante da embriogênese somática, visto que há dificuldades em se adequar protocolos de regeneração devido à ocorrência de plantas anormais, variações somaclonais, baixa eficácia na iniciação embriogênica, ineficiência dos embriões somáticos atingirem a maturação completa e a indução de calos não embriogênicos, sendo estes não funcionais na embriogênese somática (TORRES et al., 2013; ABIRI et al., 2020).

Para que o processo de regeneração se dê início, é necessário fornecer estímulos fisiológicos e bioquímicos para que os ciclos de divisão celular sejam interrompidos e dar início à diferenciação e regeneração dos embriões. Geralmente, é utilizado meios de cultura sem o acréscimo de reguladores de crescimento. O tipo e a concentração do carboidrato

utilizado no meio de cultura também são importantes para o desenvolvimento e conversão dos embriões somáticos em plantas. Além do seu papel como fonte de carbono, os carboidratos estão envolvidos na regulação do potencial osmótico das células vegetais. A concentração do carboidrato pode influenciar nos processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos, uma vez que o seu metabolismo, em plantas, é regulado de acordo com a variação da sua concentração (CARNEIRO et al., 2014; GRANJA, 2014).

Em algumas culturas de palmeiras, foi observado o uso de citocininas ou ABA na fase de regeneração dos calos. A inclusão de poliaminas, como a putrescina, na embriogênese somática contribui para a multiplicação e manutenção das massas embriogênicas e para a regeneração de embriões somáticos (CARVALHO, 2009).

Combinações de ácido abscísico (ABA), polietilenoglicol (PEG) e carvão ativado são utilizadas efetivamente em culturas de algumas coníferas e cenoura, e por isso já foram testadas em espécies de eucalipto (*E. grandis* e *E. dunnii*). Porém a utilização de ABA e PEG em eucalipto resultou na alta indução da taxa de divisão celular levando à alta taxa de proliferação de calos, sendo necessário realizar mais testes nessa área (WATT et al., 1999)

## 2.4 Suspensão Celular

A suspensão celular é uma estratégia que pode ser utilizada para a micropropagação, melhoramento genético e conservação de recursos genéticos. Assim, a cultura de células e/ou agregados e sua posterior regeneração, utilizando-se da embriogênese somática, é uma técnica de grande aplicabilidade por poder possibilitar a obtenção de grandes quantidades de explantes com baixo custo de produção (MONTEIRO, 2013).

As culturas em suspensão são geralmente iniciadas com calos friáveis em um meio líquido sob agitação (TORRES, 1989). Os calos friáveis são mais indicados em comparação com os calos compactos, já que os calos friáveis não possuem elementos de conexão vascular, estando, então, desconexos um dos outros, facilitando sua dispersão em um meio líquido e aumentando sua superfície de contato com o meio de cultura (MOURA et al., 2019). Além disso, a utilização de meio de cultura em culturas de células em suspensão pode ser diferente do utilizado em culturas de calos, devido ao fato de que muitos meios têm pouca capacidade de tamponamento e o pH pode mudar consideravelmente quando as células são introduzidas na suspensão (TORRES, 2013).

O crescimento de cultura de células em suspensão pode ser quantificados através de parâmetros selecionados em intervalos durante o ciclo de crescimento como por exemplo:

peso fresco, peso seco, número de células, índice mitótico, densidade celular e volume de células compactadas. O período de início da cultura à fase estacionária é determinado principalmente pela densidade inicial celular, duração da fase de latência (fase lag) e pela taxa de crescimento celular (TORRES, 1989).

Para as culturas de eucalipto, os primeiros registros de estabelecimento de cultura de suspensão celular foram feitos em 1965 (WATT et al., 1993). Até então, as células cultivadas em meio líquido têm sido usadas para regenerar calos, mas, nesta fase, a regeneração das plântulas ainda não foi alcançada.

## REFERÊNCIAS

- ABIRI, R. *et al.* The Prospect of Physiological Events Associated with the Micropropagation of *Eucalyptus* sp. **Forests**. 11, 1211, 2020.
- CARNEIRO, F. S. *et al.* Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesq. Agropec. Trop.** v. 44, n. 3, p 294-303, 2014.
- CARVALHO, J. M. F. C. *et al.* **Embriogênese Somática**. Campina Grande, PB. Documentos, Embrapa Algodão, 2006. ISSN 0103-0205. Setembro, 2006.
- CARVALHO, M. **Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas *in vitro* de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Viçosa: UFV, 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- CHU, C. C. *et al.* Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**. Vol XVIII, No 5. 1975.
- CORREDOIRA, E. *et al.* Induction of somatic embryogenesis in explants of shoots cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* x *E. maidenii* trees. Oxford University Press. **Tree Physiology** 00, 1 – 13, 2015.
- CORREDOIRA, E.; VIEITEZ, A. M.; BALLESTER, A.; Eucalypts (*Eucalyptus globulus* Labill.). Springer International Publishing. **Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants**. Forestry Sciences, 84, 2018.
- CORREDOIRA, E. *et al.* Non-Zygotic Embryogenesis in Hardwood Species. Taylor & Francis Group. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 2019. DOI: 10.1080/07352689.2018.1551122
- CORREIA, D. *et al.* **Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro***. Piracicaba, SP. Projeto de pesquisa, ESALQ/USP, 1995. IPEF n.48/49, p.107-116, jan./dez.1995.
- FARIA, D. V. *et al.* Wounding and medium formulation affect *de novo* shoot organogenic responses in hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 55, 277-289, 2019.
- GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of Eucalyptus. Springer. Srivastava Foundation for Science and Society. **Physiol Mol Biol Plants**. 17(1):9-23, 2011.
- GRANJA, M. M. C. **Obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas *in vitro* a partir de embriões zigótico em famílias de *Acrocomia aculeata***. Viçosa: UFV, 2014. 65 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- GRANJA, M. M. C. *et al.* Explant origin and culture media factors drive the somatic embryogenesis response in *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., an emerging oil crop in the tropics. **Industrial Crops & Products**. 117, 1-12, 2018.

GUAN, Y. *et al.* Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. **Frontiers in Plant Science**. 7:938, 2016.

HERMAN, E. B. Recent advances in plant tissue culture XXI. Media and techniques for growth, regeneration and storage: 2011–2015. **AgriTech Consultants Inc.**, Shrub Oak, NY 148 pp, 2015.

KENDURKAR, S. V.; RANGASWAMY, M. *In vitro* approaches for the improvement of Eucalyptus. Springer International Publishing. **Biotechnologies of Crop Improvement.**, v. 1, 2018.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Comb Proc Int Plant Prop Soc.** 30:421–427, 1980.

MENDES, L.; BELING, R. R.; TREICHEL, M. **Anuário Brasileiro de Silvicultura**. Santa Cruz do Sul. Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 56 p.

MONTEIRO, T. R. **Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir do uso de meios de consistência líquida e de cultivos em suspensão**. Brasília: UnB, 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. Viçosa: UFV, 2007. 83 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

MOURA, L. C. *et al.* Effects of explante type, culture media and picloram and dicamba growth regulators on induction and proliferation of somatic embryos in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**. 41 (5):e410502, 2017.

MOURA, L. C. *et al.* Auxin pulse in the induction of somatic embryos of *Eucalyptus*. **Revista Árvore**. 43(3):e430302, 2019.

MOURA, L. C. *et al.* Effect of calcium, BAP and putrescine on somatic embryo induction in juvenile explants of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* hybrids. **Australian Journal of Crop Science**. n. 13, v.04, p. 513-519, 2019.

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

PAIS, M. S. Somatic Embryogenesis Induction in Woody Species: The Future After OMICS Data Assessment. **Frontiers in Plant Science**. 10:240, 2019.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicação. Introdução: situação e perspectivas**. Lavras: UFLA/FAEPE, p.72, 2001.

PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**. Plant. 55:242–257, 2019.

- REIS, M. V. **Caracterização de massas pró-embriogênicas de ipê-branco**. Lavras: UFLA, 2010. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- RELATÓRIO ANUAL. **Indústria Brasileira de Árvores**. Instituto Brasileiro de Economia – IBRE, Fundação Getúlio Vargas, Brasília, DF. 2020.
- SANTAROSA, E.; JÚNIOR, J. F. P.; GOULART, I. C. G. R. **Transferência de tecnologia florestal: cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 138 p.
- SILVA, A. T. **Análise da expressão dos genes baby boom (BBM) e somatic embryogenesis receptor kinase (SERK) envolvidos na embriogênese somática do cafeeiro**. Lavras: UFLA, 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- SILVA, D. P. C. *et al.* Somatic embryogenesis of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: induction and maturation via indirect approach. **Plant cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**. 133:115-122, 2018.
- TEIXEIRA, S.L. Técnicas de culturas de tecidos aplicáveis às espécies florestais. In: **Anais Simpósio IUFRO “Florestas Plantadas nos Neotrópicos como Fonte de Energia”**, Viçosa, 6 - 13 fevereiro. Viçosa: 69 - 78, 1983.
- TORRES, K. C. Overview of Cell Suspension Culture. **Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops**. Van Nostrand Reinhold, 1989.
- TORRES, L. F. **Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares de *Coffea arabica***. Lavras: UFLA, 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; HERMAN, B. Establishment of Cell Suspension Cultures of *Eucalyptus grandis* and *E. grandis x camaldulensis*. **South African Forestry Journal**. No. 166, 1993.
- WATT, M. P. *et al.* Somatic Embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunni*. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Editors). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Forestry Sciences. Kluwer Academic Publishers, 1999.

## **CAPÍTULO 1**

### **INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM *Eucalyptus grandis* MEDIANTE CITOCININAS E REDUÇÃO DE NITRATO DE AMÔNIO**

## RESUMO

O eucalipto, por apresentar recalcitrância à embriogênese somática, torna o processo pela busca de um protocolo eficiente, trabalhoso e demorado. O sucesso do protocolo para obtenção da embriogênese somática depende da seleção do estágio específico de desenvolvimento do explante, das transferências sequenciais e das condições apropriadas de cultivo, como componentes do meio de cultura, temperatura e luz. Sendo assim, de modo geral, as condições ideais para a indução da embriogênese somática são únicas para cada espécie. No presente trabalho foram avaliados a calogênese de explantes de *Eucalyptus grandis* de 15 e 30 dias de idade, cultivados em dois meios de cultura, sendo eles: o meio basal MS (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 500 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 1 g.L<sup>-1</sup> de L-Prolina, 5 g.L<sup>-1</sup> de ágar); e o meio MS modificado (MSM) com 50% da concentração de nitrato de amônio (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 500 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 1 g.L<sup>-1</sup> de L-Prolina, 5 g.L<sup>-1</sup> de ágar). Além disso, foram acrescentados aos meios: Picloram 9 µM e três combinações de citocininas à 0,9 µM (2-iP, BAP e Cinetina). Os resultados mostraram que a redução de nitrato de amônio do meio de cultivo não pareceu favorecer a indução de formação de calos em *E. grandis*. A utilização de 2-iP ajudou na formação de calos amarelos semi-friáveis e a utilização de BAP favoreceu a formação de calos amarelos compactos.

**Palavras-chave:** Embriogênese Somática. Calogênese. Reguladores de Crescimento. Biotecnologia. Eucalipto.

## 1 INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é umas das técnicas da cultura de tecidos que traz benefícios quando aplicada à cultura de espécies lenhosas, podendo trazer vantagens como a propagação clonal em massa em curto período e facilidade de obtenção de cultivares modificadas geneticamente com qualidades desejadas (GRANJA, 2014; CORREDOIRA et al., 2015). Porém, a forma mais tradicional de propagação do eucalipto ainda é através de sementes e propagação vegetativa *in vivo*, devido a espécie apresentar recalcitrância à embriogênese somática (ABIRI et al., 2020). Apesar disso, a embriogênese somática é o procedimento ideal para protocolos de transformação, já que a regeneração de plantas a partir de tecidos transformados através da organogênese pode dar origem à produção de quimeras, enquanto a regeneração via embriogênese somática pode oferecer a vantagem de uma origem celular única capaz de reduzir esse problema (CORREDOIRA et al., 2019).

A embriogênese somática pode ser induzida em culturas à partir de vários tipos de explantes, tais como folhas, raízes, sementes, cotilédones, hipocótilo, segmento nodal e embriões zigóticos imaturos e maduros. Muitos estudos apontam que os embriões somáticos de eucalipto tendem a se desenvolver melhor através de folhas, embriões zigóticos, hipocótilos e cotilédones, sendo os três últimos os mais utilizados por serem derivados de partes mais juvenis da planta e ricas em tecido meristemático (MOURA et al., 2017; TRUEMAN et al., 2018). Em eucalipto, observa-se certa dificuldade na obtenção de protocolos efetivos de embriogênese somática a partir de material adulto utilizando-se explantes oriundos de árvores selecionadas. Em razão disso na maioria dos trabalhos em que obtenção de embriões somáticos foi parcialmente alcançada, utilizou-se material juvenil originando-se de sementes ou tecidos embriogênicos (TITON et al., 2007).

Outros fatores como o tipo e concentração de regulador de crescimento e meio de cultura interferem no sucesso da embriogênese somática. A combinação de auxina e citocininas pode ser fator chave na determinação da formação da embriogênese somática, provavelmente por serem dois tipos de reguladores que fazem parte da regulação do ciclo e da divisão celular. A composição do meio de cultura, além de conter nutrientes necessários à sobrevivência da planta, é imprescindível para favorecer o crescimento e o desenvolvimento do material vegetal (CARVALHO, 2006).

Também já foi relatado que a diminuição de fosfato e nitrato no meio de cultura, ajuda na formação de calos friáveis embriogênicos em *Manihot esculenta*, pois o meio de cultura

com redução desses componentes, diminui o crescimento de calos não embriogênicos (UTSUMI et al., 2017).

Atualmente, ainda não há protocolo eficaz para a embriogênese somática em eucalipto que seja eficiente comercialmente, justamente pelo fato da embriogênese somática ser genótipo-dependente (CORREDOIRA et al., 2019). Sendo assim, visando gerar mais conhecimentos a respeito dos fatores que afetam a embriogênese somática em eucalipto, o foco deste trabalho foi avaliar a combinação da auxina picloram com diferentes citocininas, a idade de explantes, bem como o efeito da redução de nitrato de amônio na indução de calos embriogênicos de *E. grandis*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular localizado na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### 2.1 Desinfestação e germinação das sementes

Sementes de *E. grandis* foram desinfestadas utilizando-se álcool 70% por 1 min e hipoclorito de sódio 3% em um eppendorf de 2 mL por 20 min. Após a lavagem com água destilada autoclavada por 3 vezes, as sementes foram inoculadas em potes estéreis contendo 40 mL de meio de cultivo ½ MS (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5 g.L<sup>-1</sup> de ágar), com pH ajustado para 5,8 ± 0,01, previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos. As sementes foram mantidas em sala de crescimento por 15 e 30 dias em fotoperíodo de 16h/8h.

### 2.2 Indução da calogênese

Plantas com 15 e 30 dias foram utilizadas para dar início à calogênese. Os explantes foram excisados em fluxo laminar horizontal, utilizando-se bisturi e pinças para a retirada do hipocótilo (0,2 - 0,3 mm) e cotilédones (1cm x 1cm). Os explantes foram, em seguida, inoculados em placas de Petri estéreis descartáveis (90 mm x 15 mm) contendo 25 mL de meio de cultivo com pH ajustado para 5,8 ± 0,01, previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos. Foram utilizados dois meios de cultura, sendo eles: meio basal MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 500 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 1 g.L<sup>-1</sup> de L-Prolina, 5 g.L<sup>-1</sup> de ágar); e meio MS modificado (MSM) com

50% da concentração de nitrato de amônio (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 500 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 1 g.L<sup>-1</sup> de L-Prolina, 5 g.L<sup>-1</sup> de ágar). A suplementação dos meios de cultura foi estabelecida de acordo com experimentos realizados previamente pelo grupo de estudos (dados não publicados). Em ambos os meios, foram acrescentados 9 µM de picloram e três combinações de citocininas à 0,9 µM: 2-iP, BAP e Cinetina (KN), totalizando assim 16 tratamentos como mostrado na tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Idade dos explantes, meios de cultura e reguladores de crescimento usado nos 16 tratamentos do experimento.

<b>Idade do explante</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Citocininas (0,9 µM)</b>
15 dias	MS básico	-
15 dias	MS básico	2-iP
15 dias	MS básico	BAP
15 dias	MS básico	KN
15 dias	MSM	-
15 dias	MSM	2-iP
15 dias	MSM	BAP
15 dias	MSM	KN
30 dias	MS básico	-
30 dias	MS básico	2-iP
30 dias	MS básico	BAP
30 dias	MS básico	KN
30 dias	MSM	-
30 dias	MSM	2-iP
30 dias	MSM	BAP
30 dias	MSM	KN

Fonte: Da autora (2021).

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro sob temperatura de 27±1°C. Os calos foram avaliados com 35 dias.

Após 35 dias, os calos foram transferidos para o meio MS básico (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 50 mg.L<sup>-1</sup> de L – cisteína, 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar) no qual foi mantido a concentração de 9 µM de picloram, mas aumentou-se para 4,5 µM a concentração das citocininas utilizadas em cada tratamento.

### **2.3 Análise histológica**

Após 43 dias no meio de maturação, os calos foram avaliados novamente e amostras foram coletadas para análise histológica. As amostras coletadas foram fixadas em FAA 70% (10% de solução de formaldeído 40% + 5% de ácido acético glacial + 50% de álcool etílico, v/v) por 24 horas sob temperatura ambiente e depois desidratadas em série etílica a 70, 80, 90 e 100% por 1 hora cada, repetindo a série etílica de 100% mais uma vez. As amostras foram infiltradas durante 24 horas com solução 1:1 de resina epóxi (Historesin® Leica) e etanol e depois 24 horas em resina pura. Após infiltração, as amostras foram emblocadas na proporção 15:1 de resina e polimerizador e mantidas na estufa a 35°C por 48h. Cortes com espessura de 5 µm foram realizados em micrótomo (Easypath EP-31-20091), posteriormente corados com solução de azul de toluidina a 0,05% (O'BRIEN et al., 1965) e visualizados em microscópio de luz (Zeiss, Axio Scope).

### **2.4 Análise estatística**

Para avaliação desse experimento foi utilizado um fatorial duplo 2x3 (Fator 1: meio; Fator 2: citocininas).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Cada repetição foi composta de três plântulas (cotilédones e a região do hipocótilo) conforme demonstrado na Figura 1. As variáveis analisadas foram porcentagem de calos e calos amarelos semi-friável. O software utilizado foi o SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2008).

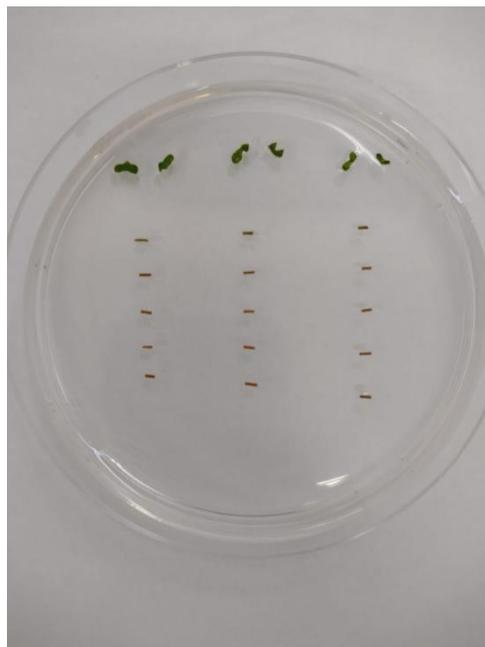


Figura 1 – Cotilédone e hipocótilo após serem inoculados em meio de indução MSM.  
Fonte: Da autora (2021).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Indução de calos em cotilédones com 15 dias

Para a variável analisada formação de calos, os resultados da análise estatística mostraram que não houve interação entre os fatores.

Para a variável analisada calo amarelo semi-friável, os resultados da análise estatística mostraram que não houve interação entre os fatores (meio de cultivo x citocininas), apenas o fator citocininas apresentou diferenças estatísticas (Tabela 2). O teste de média mostrou que o tratamento controle (sem citocininas) apresentou média superior na formação de calo amarelo semi-friável (62,50%).

Tabela 2 - Média de calos amarelos semi-friáveis de *E. grandis*, após 35 dias no meio de indução de calos.

Citocininas	Calo amarelo semi-friável
Controle	62,50 a
2-iP	35,00 ab
BAP	20,00 b
KN	30,00 ab

CV (%)

70,07

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2021).

### 3.2 Indução de calos em cotilédones com 30 dias

Para a variável analisada formação de calos, os resultados da análise estatística mostraram que houve interação entre os fatores analisados (Tabela 3). Os resultados mostraram que o meio MS mostrou-se eficaz em todos os tratamentos, sendo que o tratamento sem citocinina e o tratamento com adição de KN apresentaram 100% de formação de calos. Já para o meio MSM, o tratamento com adição de BAP se mostrou menos eficaz na formação de calos (35,00%), enquanto o tratamento utilizando 2-iP e KN no meio foram superiores com média de 95,00% e 80,00%, respectivamente.

Tabela 3 - Média de formação de calos de *E. grandis*, após 35 dias no meio de indução de calos.

Citocininas	Meio MS	Meio MSM
Controle	100,00 Aa	75,00 Aab
2-iP	95,00 Aa	95,00 Aa
BAP	90,00 Aa	35,00 Bb
KN	100,00 Aa	80,00 Aa
CV (%)	29,99	

Letras maiúsculas iguais na linha (entre os meios), letras minúsculas iguais na coluna (entre as citocininas), não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2021).

Para a formação de calo amarelo semi-friável houve interação significativa entre os fatores avaliados (meios de cultivo x citocininas) (Tabela 4). A adição de 2-iP no meio MS (70,00%) mostrou superioridade de formação de calos amarelos semi-friáveis, do que a utilização da mesma citocinina no meio MSM (15,00%). A utilização de 2-iP no meio MS também apresentou média superior significativa quando comparados aos outros tratamentos utilizando o meio MS.

Tabela 4 - Média de calos amarelos semi-friáveis de *E. grandis*, após 35 dias no meio de indução de calos.

Citocininas	Meio MS	Meio MSM
Controle	05,00 Ab	35,00 Aa
2-iP	70,00 Aa	15,00 Ba
BAP	00,00 Ab	10,00 Aa
KN	35,00 Aab	00,00 Aa
CV (%)	74,24	

Letras maiúsculas iguais na linha (entre os meios), letras minúsculas iguais na coluna (entre as citocininas), não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2021).

### 3.3 Indução de calos em hipocótilos com 30 dias

Para a variável analisada calo amarelo semi-friável não houve interação para entre os fatores avaliados (meios de cultivo x citocininas), houve diferença significativa somente para o fator avaliado citocinina (Tabela 5). Os tratamentos, controle (50,00%) e com adição de 2-iP (65,00%) apresentaram as maiores médias de formação de calos amarelos semi-friáveis diferenciando estatisticamente dos outros dois tratamentos.

Tabela 5 - Média de calos amarelos semi-friável de *E. grandis*, após 35 dias no meio de indução de calos.

Citocininas	Calo amarelo semi-friável
Controle	50,00 a
2-iP	65,00 a
BAP	30,00 b
KN	30,00 b
CV (%)	94,19

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2021).

A média superior de formação de calos amarelos semi-friáveis no tratamento sem citocinina (tabela 2) corrobora com o fato de as auxinas possuírem uma capacidade quase única de estimularem a embriogênese somática em muitas espécies de plantas (MOURA et al., 2017; PAIS, 2019). Segundo Carvalho (2006) a auxina é considerada o hormônio mais importante na regulação da formação de embriões somáticos e é provável que essa regulação seja essencial para iniciar a simetria bilateral durante a indução da embriogênese somática.

Contudo, a inclusão da citocinina ao meio suplementado com auxina, pode garantir uma divisão celular mais eficiente permitindo a formação e multiplicação das estruturas embriogênicas. A utilização de citocininas em conjunto com auxina na indução da embriogênese somática já foi reportada por Granja (2014), trabalhando com embriões zigóticos maduros de *Acrocomia aculeata* em que relatou que o balanço auxina (picloram)/citocinina (2-iP) foi mais favorável na indução de células embriogênicas do que apenas em um meio suplementado com Picloram. A utilização de 2-iP no presente trabalho se destacou das outras citocininas utilizadas para a formação da característica desejada de calos amarelos semi-friáveis (Tabela 4 e 5), que, como reportado por Titon (2005) trabalhando com *Eucalyptus grandis* relatou que os calos amarelos de aparência friável ou semi-friável, apresentaram maior características embriogênicas.

A adição de BAP pareceu influenciar na formação de calos amarelos compactos tanto em cotilédones quanto em hipocótilos. A utilização de BAP em combinação com uma auxina (2,4-D) foi relatada por Carneiro et al. (2014) em *Agave sisalana*, que obteve calos embriogênicos de aparência compacta ou semicompacta. Moura et al. (2019) também obteve calos embriogênicos no híbrido *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* utilizando Picloram em combinação com BAP.

Quanto aos meios MS e MSM, apenas há diferença significativa quando se utiliza cotilédone com 30 dias como explante (Tabelas 3 e 4). Segundo Utsumi et al. (2017) a redução de nitrato nas formas de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), parece se fazer necessária para a indução da embriogênese somática de *Manihot esculenta*. A redução de 50% da concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e/ou  $\text{KNO}_3$  no meio MS vem sendo estudada na embriogênese somática de *Corymbia citriodora*, *E. dunii* e *E. microtheca* (TRUEMAN et al., 2018). A utilização de uma fonte alternativa de nitrogênio como suplemento de nitrato é utilizada em espécies lenhosas, como constatado por Corredoira et al. (2019). O nitrogênio pode ser fornecido nas formas de aminoácidos, como a prolina, ou como complexos de aminoácidos, como no caso da caseína hidrolisada. No presente trabalho, a redução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  no meio MSM pareceu não ser eficiente e/ou não apresentou diferença significativa em relação ao meio MS.

A oxidação de calos em cotilédone com 30 dias apresentou maiores médias no tratamento sem adição de citocininas. A oxidação dos tecidos ocorre devido à uma situação de estresse ocorrendo liberação de compostos fenólicos, que em baixos níveis, pode causar mudanças na fisiologia e no metabolismo da célula vegetal, induzindo mecanismos de

adaptação como processos de cicatrização, organogênese e embriogênese somática. Moura et al. (2019) relatou que no híbrido *E. urograndis*, diferentemente de algumas espécies não-lenhosas, a oxidação calo é um processo que pode anteceder a formação do embrião.

### 3.4 Análise histológica

Após 40 dias no meio de indução, amostras foram retiradas para a análise histológica. Foi possível observar que alguns calos apresentaram estruturas organizadas, mostrando algum nível de diferenciação celular (seta). Alguns calos contendo estruturas brancas, encontradas principalmente em calos oxidados, apresentaram células isodiamétricas pouco vacuoladas, características comuns de células meristemáticas. Na figura 2, pode-se observar o início de formação de estruturas organizadas.

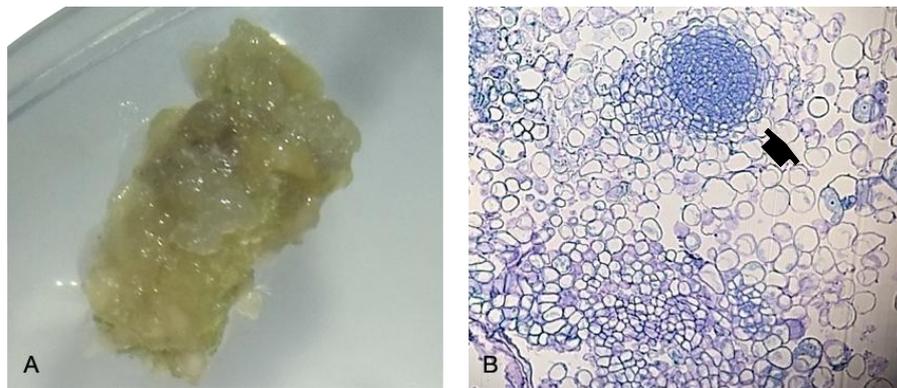


Figura 2 – Calo formado a partir de cotilédone (15 dias) após 45 dias em meio de indução MS sem adição de citocinina. (A) Visualização em lupa com aumento de 0,65x; (B) Lâmina histológica corada com azul de Toluidina visualizado em microscópio de luz em aumento de 10x.

Fonte: Da autora (2021).

Na figura 3, há estruturas que se assemelham ao início de formação de globular do embrião (seta), com possível diferenciação cotiledonar e estruturas que se assemelham ao estágio cordiforme (seta hachurada).

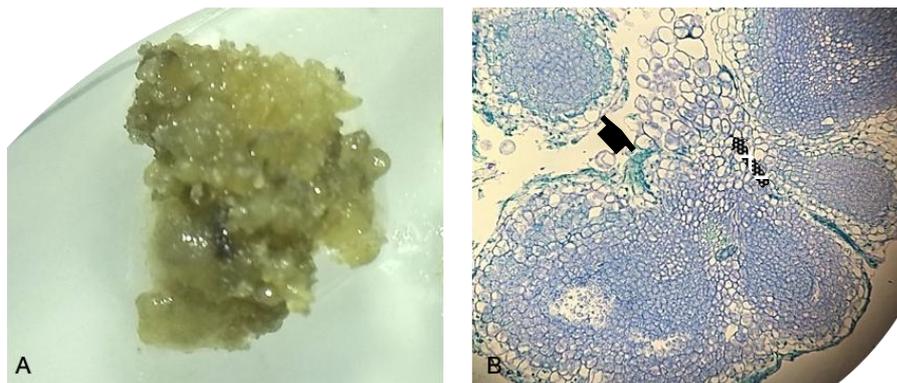


Figura 3 – Calo formado a partir de cotilédone (15 dias) após 45 dias em meio de indução MSM sem adição de citocinina. (A) Visualização em lupa com aumento de 0,65x; (B) Lâmina histológica corada com azul de Toluidina visualizado em microscópio de luz em aumento de 10x.

Fonte: Da autora (2021).

Na figura 4, é possível visualizar organização celular, podendo visualizar a protoderme (seta), com meristema apical em formação.

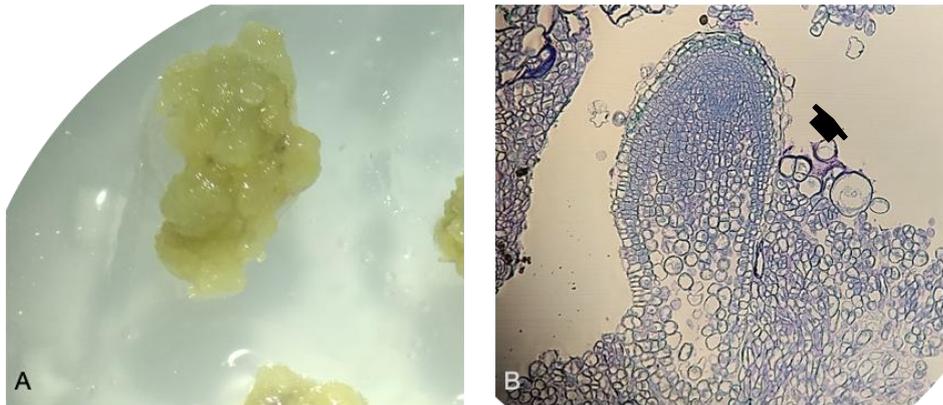


Figura 4 - Calo formado a partir de cotilédone (30 dias) após 45 dias em meio de indução MS com adição de 2-iP. (A) Visualização em lupa com aumento de 0,65x; (B) Lâmina histológica corada com azul de Toluidina visualizado em microscópio de luz em aumento de 20x.

Fonte: Da autora (2021).

Na figura 5, pode-se observar a formação de uma protuberância consistindo de células parenquimais (seta).

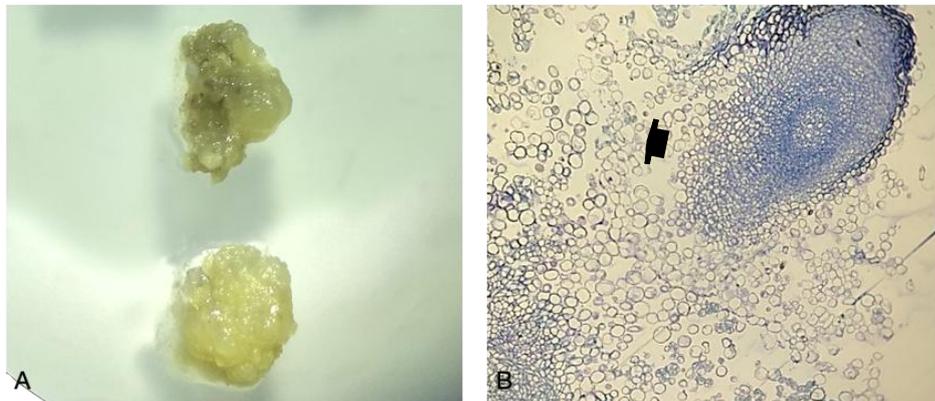


Figura 5 - Calo formado a partir de hipocótilo (30 dias) após 45 dias em meio de indução MS com adição de 2-iP. (A) Visualização em lupa com aumento de 0,65x; (B) Lâmina histológica corado com azul de Toluidina visualizado em microscópio de luz em aumento de 20x.

Fonte: Da autora (2021).

#### 4 CONCLUSÃO

Após a realização do presente estudo, pode-se concluir que a utilização de citocininas em concentração baixa de 0,9  $\mu\text{M}$  acompanhadas da auxina Picloram, é facultativo para a formação de calos amarelos semi-friáveis em *E. grandis*, visto que a formação ocorreu no

grupo controle apenas com a adição de auxina no meio. A adição da citocinina BAP parece influenciar na formação de calos compactos

A redução de nitrato de amônio do meio de cultivo não pareceu favorecer a indução de formação de calos.

Novos estudos a respeito da embriogênese somática do eucalipto precisam ser feitos já que a fase de maturação e regeneração dos embriões não foi completamente elucidada, necessitando de protocolos que sejam reproduzíveis.

## REFERÊNCIAS

- ABIRI, R. *et al.* The Prospect of Physiological Events Associated with the Micropropagation of *Eucalyptus* sp. **Forests**. 11, 1211, 2020.
- CARNEIRO, F. S. *et al.* Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesq. Agropec. Trop.** v. 44, n. 3, p 294-303, 2014.
- CARVALHO, J. M. F. C. *et al.* **Embriogênese Somática**. Campina Grande, PB. Documentos, Embrapa Algodão, 2006. ISSN 0103-0205. Setembro, 2006.
- CORREDOIRA, E. *et al.* Induction of somatic embryogenesis in explants of shoots cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* x *E. maidenii* trees. Oxford University Press. **Tree Physiology** 00, 1 – 13, 2015.
- CORREDOIRA, E. *et al.* Non-Zygotic Embryogenesis in Hardwood Species. Taylor & Francis Group. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 2019. DOI: 10.1080/07352689.2018.1551122
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, dez. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1413-70542011000600001>.
- GRANJA, M. M. C. **Obtenção e manutenção de linhagens embriogênicas *in vitro* a partir de embriões zigóticos em famílias de *Acrocomia aculeata***. Viçosa: UFV, 2014. 65 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- MOURA, L. C. *et al.* Effects of explante type, culture media and picloram and dicamba growth regulators on induction and proliferation of somatic embryos in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**. 41 (5):e410502, 2017.
- MOURA, L. C. *et al.* Auxin pulse in the induction of somatic embryos of *Eucalyptus*. **Revista Árvore**. 43(3):e430302, 2019.
- MOURA, L. C. *et al.* Effect of calcium, BAP and putrescine on somatic embryo induction in juvenile explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* hybrids. **Australian Journal of Crop Science**. n. 13, v.04, p. 513-519, 2019.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**. 15:473–497, 1962.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, jun. 1964. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf01248568>.
- PAIS, M. S. Somatic Embryogenesis Induction in Woody Species: The Future After OMICS Data Assessment. **Frontiers in Plant Science**. 10:240, 2019.

TITON, M. **Indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis***. Viçosa: UFV, 2005. 121 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

TITON, M. *et al.* Efeito dos Reguladores de Crescimento Dicamba e Picloram na Embriogênese Somática em *Eucalyptus grandis*. Sociedade de Investigações Florestais. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.3, p.417-426, 2007.

TRUEMAN, S.; HUNG, C.; WENDLING, I. Tissue Culture of Corymbia and Eucalyptus. **Forests**, v. 9, n. 2, p. 84, 9 fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/f9020084>.

UTSUMI, Y. *et al.* Formation of friable embryogenic callus in cassava is enhanced under conditions of reduced nitrate, potassium and phosphate. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0180736, 14 ago. 2017.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA DE CALOS DE *Eucalyptus grandis* OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES MEIOS, EXPLANTES E DOSES DE PICLORAM**

## RESUMO

A embriogênese somática é uma das técnicas da cultura de tecidos que traz benefícios quando aplicada à cultura de espécies lenhosas, trazendo vantagens como a propagação clonal em massa em curto período de tempo e facilidade de obtenção de cultivares com qualidades desejadas. Entretanto, o eucalipto apresenta recalcitrância à embriogênese somática, levando a baixa eficiência de indução e baixa frequência de germinação de embriões, tornando a sua aplicação limitada. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar três meios de cultivo, MS, N6 e JADS, para a indução de calos embriogênicos, contendo diferentes concentrações da auxina picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) (0, 100, 200, 400 e 800  $\mu\text{M}$ ), usando como explantes folhas e hipocótilo de plântulas de eucalipto com 30 dias. As avaliações foram realizadas após 30 dias e foram avaliados a porcentagem de formação de calos e formação de calo amarelo, calo amarelo com oxidação e calo oxidado. Os três meios apresentaram alta formação de calos em todos os tratamentos testados. Para os explantes hipocótilo e folha, os meios N6 e JADS têm potencial para obtenção da embriogênese somática. Os tratamentos testados mostraram que é possível obter calos embriogênicos de eucalipto de alta qualidade, fato comprovado mediante as análises histológicas.

**Palavras-chave:** Auxina. Calogênese. Meio de Cultura. Biotecnologia. Embriogênese Somática.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* é conhecido por ter espécies lenhosas de grande aplicabilidade nas indústrias madeireira, de celulose e papel e até mesmo na indústria farmacêutica com produção de óleos essenciais. A propagação do Eucalipto ocorre principalmente através de sementes e propagação vegetativa, porém quando aplicada as técnicas de melhoramento genético convencional para obtenção de melhores linhagens, costuma-se ter um processo demorado, pois o eucalipto possui alto nível de heterozigosidade (PÁDUA et al., 2018).

As técnicas biotecnológicas surgiram como forma de contribuir para uma maior celeridade no melhoramento convencional, no entanto, para algumas espécies, a falta de um sistema efetivo de regeneração de plantas faz com que esta tecnologia se torne onerosa e demorada (DOBROWOLSKA et al., 2016).

A embriogênese somática é um processo assexual no qual as células haploides ou somáticas se desenvolvem e seguem os estágios característicos do desenvolvimento dos embriões zigóticos, produzindo descendentes sem a fusão de gametas (SILVA et al., 2017). A formação indireta de embriões somáticos passa pela formação de calos, que são massas celulares desdiferenciadas que podem ser induzidas a partir de diferentes partes da planta em condições *in vitro*, sob influência dos meios de cultivo e reguladores de crescimento (SHWE & LEUNG, 2020).

O meio de cultura mais utilizado na indução da embriogênese somática de diversas espécies de eucalipto é o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), que é rico em nitrogênio na forma de nitrato de amônio e tem se mostrado benéfico para a indução de embriogênese somática para algumas culturas (KENDURKAR & RANGASWAMY, 2018).

Contudo, baixos níveis de potencial embriogênico foram observados em espécies de eucalipto (TORRES et al., 1989; PAIS, 2019), apresentando recalcitrância à embriogênese somática e dificultando sua eficiência na obtenção de embriões somáticos (ABIRI et al., 2020). Sendo assim, ainda não há nenhum protocolo eficaz para a embriogênese somática de eucalipto que seja eficiente e reprodutível. As buscas para otimização de protocolos são feitas a partir de tentativa e erro, e por isso as condições ideais para a indução da embriogênese somática são únicas para cada espécie (CORREDOIRA et al., 2019). Nesse trabalho o foco foi avaliar os diferentes meios de cultivo MS, N6 e JADS com suplementação da auxina picloram na indução de calos embriogênicos de *E. grandis*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular localizado na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### 2.1 Teste 1

#### 2.1.1 Desinfestação e germinação de sementes

Sementes de *E. grandis* foram desinfestadas utilizando-se álcool 70% por 1 min e hipoclorito de sódio 3% em um eppendorfs de 2 mL por 20 min. Após a lavagem com água destilada autoclavada por 3 vezes, as sementes foram inoculadas em potes estéreis contendo 40 mL de meio de cultivo ½ MS (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5 g.L<sup>-1</sup> de ágar), com pH ajustado para  $5,8 \pm 0,01$ , previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos. As sementes foram mantidas em sala de crescimento por 30 dias em fotoperíodo de 16h/8h.

#### 2.1.2 Indução da calogênese

Após 30 dias, os explantes hipocótilo (0,2 - 0,3 mm) e folhas (1cm x 1cm) foram excisados com auxílio de bisturis e pinças em fluxo laminar horizontal. Os explantes foram, em seguida, inoculados em placas de Petri estéreis descartáveis (90 mm x 15 mm) contendo 25 mL de meio de cultivo com pH ajustado para  $5,8 \pm 0,01$ , previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos.

Foram testados três meios de cultivo de indução para obtenção de calos embriogênicos, sendo: MS; JADS (CORREIA et al., 1995); e N6 (CHU et al., 1975), todos contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, com pH ajustado para  $5,8 \pm 0,01$ , previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos. Foram adicionados ao meio de cultura 100; 200; 400 e 800 µM de picloram e um tratamento sem adição de regulador de crescimento (controle) como mostrado na tabela 1. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Tabela 1 - Reguladores de crescimento e meio de cultura usado nos 15 tratamentos do experimento.

<b>Tratamento</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Picloram (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
T1	MS	0
T2	MS	100
T3	MS	200
T4	MS	400
T5	MS	800
T6	JADS	0
T7	JADS	100
T8	JADS	200
T9	JADS	400
T10	JADS	800
T11	N6	0
T12	N6	100
T13	N6	200
T14	N6	400
T15	N6	800

Fonte: Da autora (2021).

Após 60 dias, os calos amarelos com aspecto friável ou semi-friável foram selecionados e transferidos para o meio de cultura N6 (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar), contendo 2  $\mu\text{M}$  de picloram e foram mantidos em sala de crescimento no escuro sob temperatura de 27 $\pm$ 1°C. Já os calos remanescentes, de coloração escura (oxidado) e/ou que apresentaram estruturas brancas, semelhantes ao aspecto embrionário, foram transferidos para o meio ½ MS (20 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g.L<sup>-1</sup> de ágar) e mantidos em sala de crescimento sob “meia luz” em fotoperíodo de 16h/8h e temperatura de 27 $\pm$ 1°C.

### **2.1.3 Análise histológica**

Após 60 dias no meio de indução do teste 1, os calos foram avaliados e amostras foram coletadas para análise histológica. As amostras coletadas foram fixadas em FAA 70% (10% de solução de formaldeído 40% + 5% de ácido acético glacial + 50% de álcool etílico, v/v) por 24 horas sob temperatura ambiente e depois desidratadas em série etílica a 70, 80, 90

e 100% por 1 hora cada, repetindo a série etflica de 100% mais uma vez. As amostras foram infiltradas durante 24 horas com solução 1:1 de resina epóxi (Historessin® Leica) e etanol e depois 24 horas em resina pura. Após infiltração, as amostras foram emblocadas na proporção 15:1 de resina e polimerizador e mantidas na estufa a 35°C por 48h. Cortes com espessura de 5 µm foram realizados em micrótomo (Easypath EP-31-20091), posteriormente corados com solução de azul de toluidina a 0,05% (O'BRIEN et al., 1965) e visualizados em microscópio de luz (Zeiss, Axio Scope).

#### 2.1.4 Análise estatística

Para avaliação do teste 1 foi utilizado um fatorial duplo 3x5 (Fator 1: Meios; Fator 2: Doses de Picloram).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Cada repetição foi composta de três plântulas, conforme demonstrado na Figura 1. As variáveis analisadas foram porcentagem de calos, calo amarelo, calo amarelo com oxidação e calo oxidado. O software utilizado foi o SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2008).

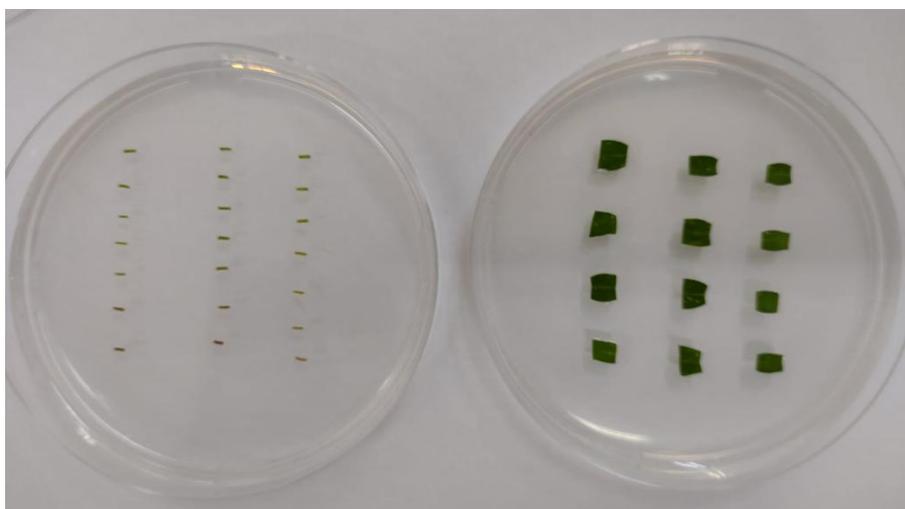


Figura 1 – Placas de Petri contendo hipocótilo (esquerda) e folha (direita) de *E. grandis*.  
Fonte: Da autora (2021).

## 2.2 Teste 2

### 2.2.1 Desinfestação e germinação das sementes

Sementes de *E. grandis* foram desinfestadas utilizando-se álcool 70% por 1 min e hipoclorito de sódio 3% em eppendorfs de 2 mL por 20 min. Após a lavagem com água destilada autoclavada por 3 vezes, as sementes foram inoculadas em potes estéreis contendo

40 mL de meio de cultivo  $\frac{1}{2}$  MS (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5 g.L<sup>-1</sup> de ágar), com pH ajustado para  $5,8 \pm 0,01$ , previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos. As sementes foram mantidas em sala de crescimento por 30 dias em fotoperíodo de 16h/8h.

### 2.2.2 Indução de calos

Após 30 dias, os explantes foram excisados em fluxo laminar horizontal, utilizando-se bisturi e pinças para a retirada do hipocótilo (0,2 mm - 0,3 mm) e folhas (1cm x 1cm). Os explantes foram, em seguida, inoculados em placas de Petri estéreis descartáveis (90 mm x 15 mm) contendo 25 mL de meio de cultivo com pH ajustado para  $5,8 \pm 0,01$ , previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos.

O teste 2 consistiu então, da repetição do melhor resultado do meio de cultura obtido no teste 1. Sendo assim, o meio N6 (30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar), com pH ajustado para  $5,8 \pm 0,01$ , previamente autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm durante 20 minutos, foi utilizado para obtenção novamente dos calos embriogênicos. Foram repetidas as concentrações do regulador de crescimento do teste 1. Desta forma, foram adicionados ao meio de cultura 100; 200; 400 e 800 µM de Picloram e um tratamento como controle foi utilizado, sem adição da auxina, como mostrado na tabela 2. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro sob temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Tabela 2 - Concentração de Picloram utilizados no teste 2.

<b>Tratamento</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Picloram (µM)</b>
T1	N6	0
T2	N6	100
T3	N6	200
T4	N6	400
T5	N6	800

Fonte: Da autora (2021).

### 2.2.3 Análise estatística

Para avaliação desse experimento foi utilizado um fatorial duplo 2x5 (Fator 1: Explantes; Fator 2: Doses de Picloram).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Cada repetição foi composta de três plântulas (3 pares de folhas e a região do hipocótilo foram seccionados e inoculados em meio de indução de calos). As variáveis analisadas foram porcentagem de calos, calo amarelo intenso, calo amarelo com oxidação, calo oxidado e calo oxidado com estrutura branca. O software utilizado foi o SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2008).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Teste 1**

A partir da calogênese, aos 60 dias no meio de indução, obteve-se calos das mais diversas características. Os calos foram analisados quanto à cor, friabilidade, aspecto mucilaginoso, presença de estruturas brancas na superfície do calo e presença de raízes. A friabilidade e as diferenças organográficas foram avaliadas de forma visual, à medida que se destacavam dentro de um tratamento específico. Calos amarelos de aparência friável ou semi-friável foram os calos de interesse como mostrado nas figuras 2 e 3.

Os calos amarelos friáveis ou semi-friáveis foram reportadas por Titon et al. (2007) como potencial material vegetal para obtenção de células embriogênicas em *E. grandis*. Por serem friáveis, foram o material de interesse para a possível iniciação de suspensão celular. Porém, como não há nenhum protocolo eficaz reprodutível para a embriogênese somática do eucalipto, outras características não foram ignoradas no presente trabalho.

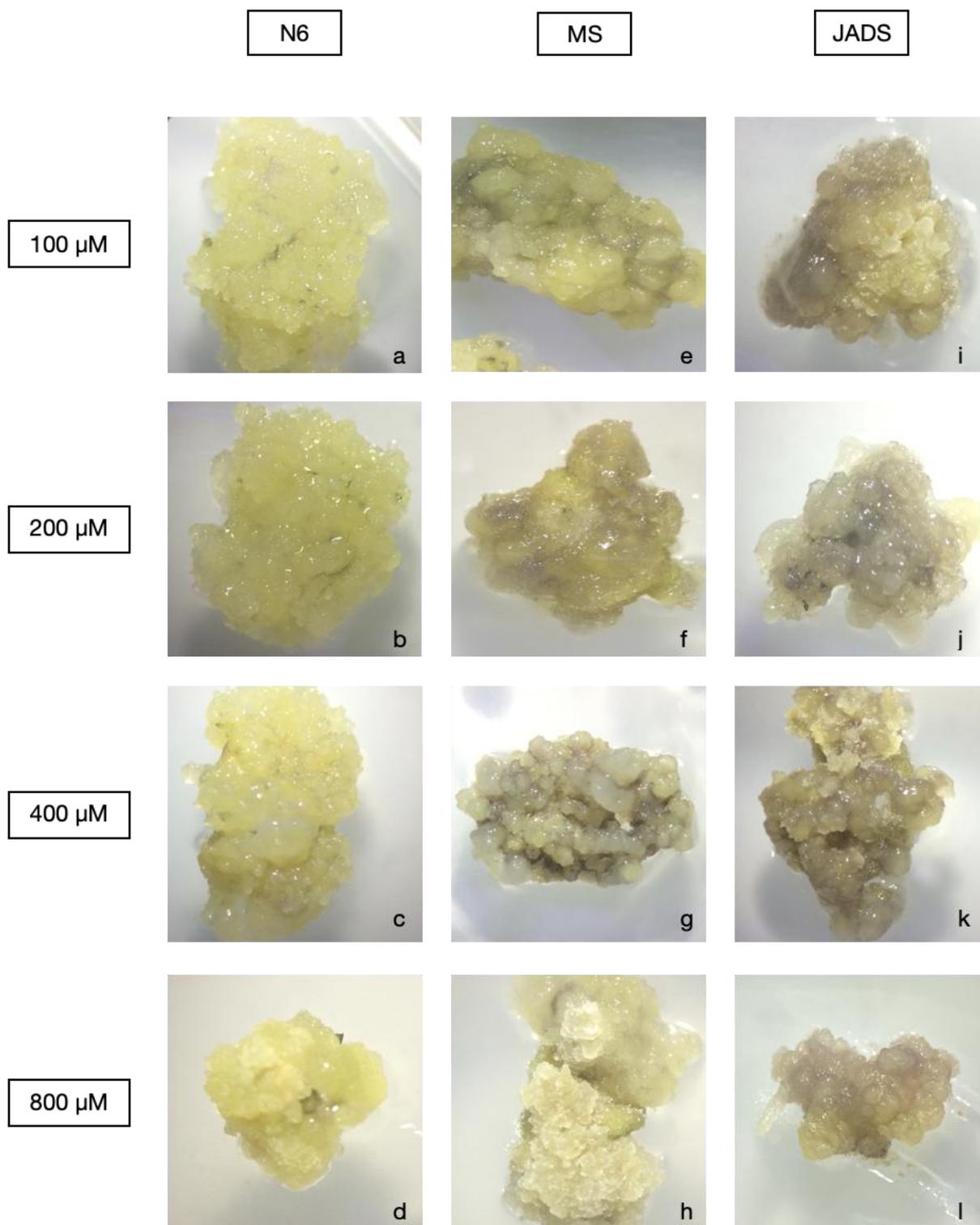


Figura 2 - Diferentes calos amarelos obtidos a partir de folhas de *E. grandis*, no meio de indução com 60 dias. (a) Calo amarelo claro; (b) Calo amarelo intenso; (c) Calo amarelo com mucilagem (d) Calo amarelo aquoso com estrutura compacta; (e) Calo amarelo aquoso; (f) Calo amarelo oxidado; (g) Calo amarelo oxidado com estrutura branca; (h) Calo amarelo compacto; (i) Calo amarelo compacto com oxidação; (j) Calo amarelo aquoso com oxidação; (k) Calo amarelo oxidado aquoso com estrutura compacta; (l) Calo amarelo aquoso com oxidação e raiz.

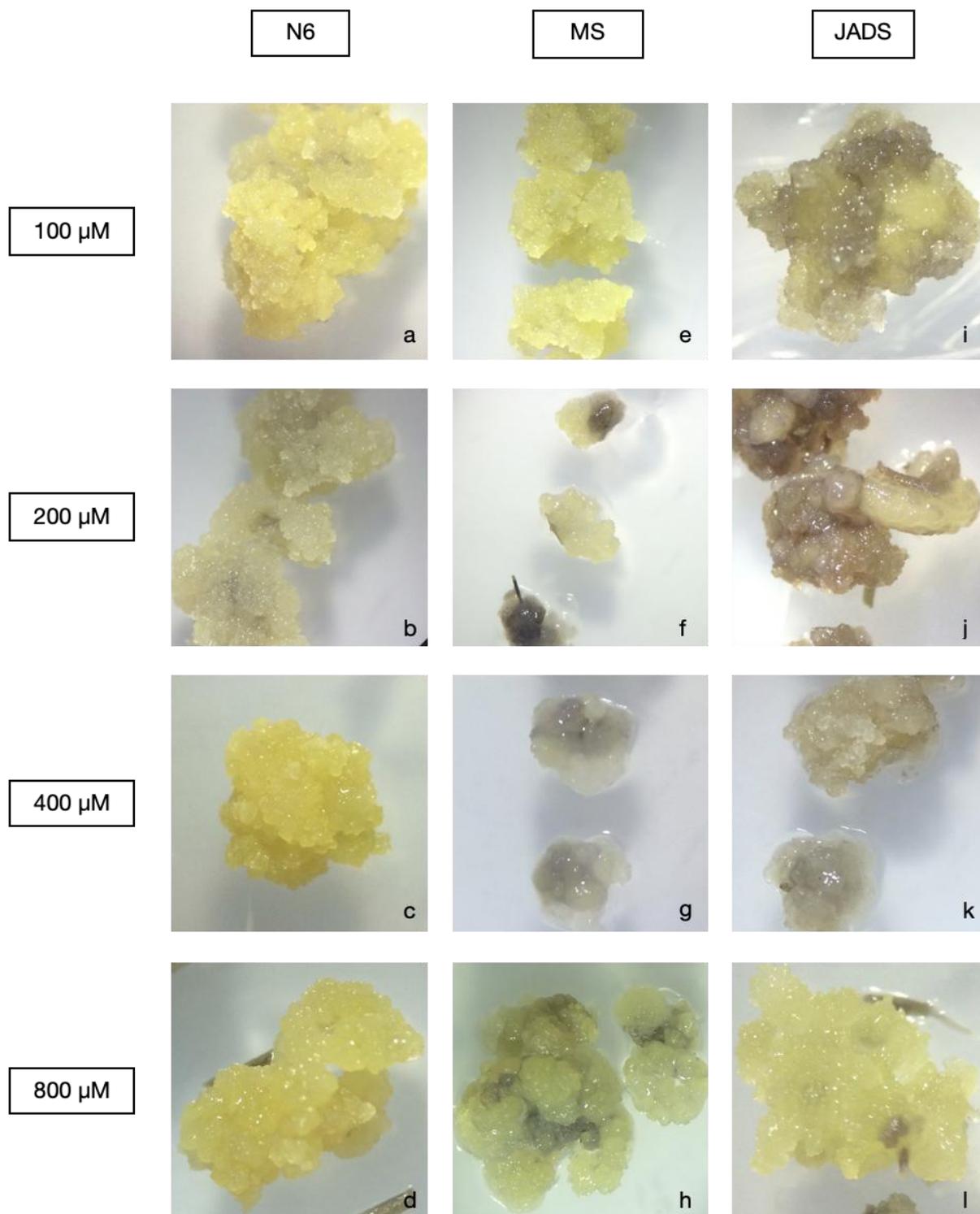


Figura 3 - Diferentes calos amarelos obtidos a partir de hipocótilo de *E. grandis*, no meio de indução com 60 dias. (a) Calo amarelo friável; (b) Calo amarelo oxidado; (c) Calo amarelo semi-friável (d) Calo amarelo; (e) calo amarelo claro; (f) calo mucilaginoso com oxidação; (g) estrutura mucilaginosa; (h) calo amarelo aquoso com oxidação; (i) calo amarelo com oxidação; (j) Calo oxidado com estrutura branca; (k) calo amarelo oxidado aquoso; (l) Calo amarelo claro aquoso.

### 3.1.1 Explante folha

A utilização de altas concentrações de auxina parece ter um efeito positivo na indução de embriogênese somática do eucalipto (KENDURKAR & RANGASWAMY, 2018). No presente trabalho, altas doses de Picloram foram testadas, utilizando-se três meios diferentes.

Na análise estatística do teste 1, utilizando folha como explante, mostrou que para a variável analisada calo amarelo, houve interação dupla entre os fatores (meios de cultivo x doses de Picloram) (Tabela 3). Os resultados mostraram que o tratamento utilizando meio N6 na concentração de 200  $\mu\text{M}$  foi superior para formação de calos amarelos em comparação com os demais meios de cultivo. O meio JADS, conseguiu a formação de calos amarelos apenas no tratamento com adição de 400  $\mu\text{M}$ , sendo superior aos outros meios N6 (13,33%) e MS (0,0%) quando utilizando essa mesma concentração de Picloram. Para o meio MS, as concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$  de Picloram tiveram médias maiores de formação de calo amarelo, com 26,66% e 26,64% respectivamente, em relação às outras doses de Picloram utilizadas no mesmo meio.

Tabela 3 – Média de calos amarelos de *E. grandis* explante folha, após 60 dias no meio de indução de calos.

Picloram ( $\mu\text{M}$ )	Folha		
	N6	MS	JADS
0	00,00 Ab	00,00 Ab	00,00 Ab
100	13,33 Ab	26,66 ABa	00,00 Bb
200	<b>53,32 Aa</b>	26,64 ABa	00,00 Bb
400	13,33 ABb	00,00 Bb	33,33 Aa
800	10,00 Ab	10,00 Aab	00,00 Ab
CV (%) = 75,02			

Letras maiúsculas iguais na linha (entre os meios de cultivo), letras minúsculas iguais na coluna (entre as doses de Picloram), não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2021).

Esse resultado mostrou que as doses elevadas de Picloram (800  $\mu\text{M}$ ) nos três diferentes meios de cultura, não foram eficazes para a formação de calos amarelos em folhas de *E. grandis*. A concentração de 200  $\mu\text{M}$  de Picloram no meio N6 atingiu a maior média de formação de calos amarelos, passando de 50% de formação. Já o meio JADS não apresentou formação de calos amarelos em nenhum dos tratamentos, exceto quando utilizou-se 400  $\mu\text{M}$  de Picloram. A diferença da eficácia entre os meios de cultura, pode estar relacionada com a

composição do meio cultura e a disponibilidade de cada nutriente, alterando o modo como cada componente é absorvido pela planta, e conseqüentemente, influenciando o desenvolvimento do tecido vegetal (MOURA et al., 2019).

Essa diferença entre os meios de cultura pode, possivelmente, ter causado as diferenças organográficas, influenciando a formação de calo amarelo com oxidação, calo oxidado e calo oxidado com estrutura branca, como é mostrado nos resultados seguintes.

A análise estatística para a variável calo amarelo com oxidação mostraram interação dupla entre os fatores analisados (meios de cultivo x doses de Picloram) (Tabela 4). Ao aumentar as doses de Picloram no meio JADS, há aumento na formação de calos amarelos com oxidação sendo que os tratamentos com 400 e 800  $\mu\text{M}$  de Picloram tiveram maiores médias, 66,66% e 73,32% respectivamente. Em relação ao meio MS, os tratamentos com 100 e 800  $\mu\text{M}$  tiveram ambos, média de formação de calo amarelo com oxidação de 13,33%, e para o tratamento com 400  $\mu\text{M}$ , houve média de 19,99%. Para o meio N6, a dose de 200  $\mu\text{M}$  diferiu estatisticamente das demais doses, com média superior de 26,64% de formação de calos amarelos contendo oxidação.

Tabela 4 – Média de calos amarelos com oxidação de *E. grandis* explante folha, após 60 dias no meio de indução de calos.

Picloram ( $\mu\text{M}$ )	Folha		
	N6	MS	JADS
0	00,00 Ab	00,00 Ab	00,00 Ab
100	13,33 Aab	13,33 Aa	13,33 Ab
200	26,64 Aa	00,00 Bb	56,66 Aa
400	23,33 Bab	19,99 Ba	66,66 Aa
800	00,00 Bb	13,33 Ba	73,32 Aa

CV (%) = 51,58

Letras maiúsculas iguais na linha (entre os meios de cultivo), letras minúsculas iguais na coluna (entre as doses de Picloram), não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2021).

Para a variável calo oxidado, os resultados mostraram interação dupla entre os fatores analisados (meios de cultivo x doses de Picloram) (Tabela 5). A adição de 100 (86,66%) e 200  $\mu\text{M}$  (26,64%) ao meio JADS resultou em média superior de formação de calos oxidados em relação aos outros meios de cultivo com as mesmas doses de Picloram. Para o meio N6 e MS, as doses de Picloram não diferiram estatisticamente.

Tabela 5 – Média de calos oxidados de *E. grandis* explante folha, após 60 dias no meio de indução de calos.

Picloram ( $\mu\text{M}$ )	Folha		
	N6	MS	JADS
0	00,00 Aa	00,00 Aa	00,00 Ac
100	13,33 Ba	13,00 Ba	86,66 Aa
200	00,00 Ba	00,00 Ba	26,64 Ab
400	00,00 Aa	00,00 Aa	00,00 Ac
800	13,33 Aa	00,00 Ba	13,33 Abc
CV (%) = 65,08			

Letras maiúsculas iguais na linha (entre os meios de cultivo), letras minúsculas iguais na coluna (entre as doses de Picloram), não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2021).

A formação de calo oxidado com estrutura branca foi observada em alguns tratamentos, e por vezes apresentavam visualmente, características semelhantes a estruturas embrionárias. A análise estatística dessa variável mostrou que houve interação dupla entre os fatores analisados (meios de cultivo x doses de Picloram) (Tabela 6). Para o meio JADS, não houve nenhuma formação de calo com essas características. Para o meio N6, a aplicação de 100  $\mu\text{M}$  de Picloram resultou em maior média (39,99%) em relação aos tratamentos com outras doses de Picloram, e também em relação à mesma dose aplicada ao meio MS (19,99%). Para o meio MS, o tratamento que apresentou maior média de formação de calo oxidado com estruturas brancas foi o tratamento com 200  $\mu\text{M}$  de Picloram (26,66%).

Tabela 6 – Média de calos oxidados com estrutura branca de *E. grandis* explante folha, após 60 dias no meio de indução de calos.

Picloram ( $\mu\text{M}$ )	Folha		
	N6	MS	JADS
0	00,00 Ac	00,00 Ab	00,00 Aa
100	39,99 Aa	19,99 Bab	00,00 Ca
200	06,66 Bbc	26,66 Aa	00,00 Ca
400	26,66 Aab	06,66 Bab	00,00 Ba
800	00,00 Ac	00,00 Ab	00,00 Aba
CV (%) = 70,27			

Letras maiúsculas iguais na linha (entre os meios de cultivo), letras minúsculas iguais na coluna (entre as doses de Picloram), não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2021).

### 3.1.2 Explante hipocótilo

Utilizando hipocótilo como explante, a análise estatística mostrou que para a variável calo amarelo, os resultados mostraram interação dupla entre os fatores (meios de cultivo x doses de Picloram) (Tabela 7). O meio JADS apresentou diferença para o tratamento com 800  $\mu\text{M}$  de Picloram, onde apresentou a maior média (39,60%) em comparação com os demais meios. O tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de Picloram, apresentou maiores médias de formação de calo amarelo nos meios N6 (39,60%) e MS (53,00%) em comparação com o meio JADS (0,0%). No meio MS, conforme se elevou a dose de Picloram, 100  $\mu\text{M}$  (53,00%); 200  $\mu\text{M}$  (33,00%); 400  $\mu\text{M}$  (0,00%) e 800  $\mu\text{M}$  (26,40%) houve diminuição na porcentagem média de formação de calo amarelo. Para o meio N6, a diminuição ocorre quando se eleva a dose para 400  $\mu\text{M}$  (06,60%). No meio JADS ocorreu o inverso, conforme se aumenta as doses de Picloram, aumenta-se o número de calos amarelos.

Tabela 7 – Média de calos amarelos de *E. grandis* explante hipocótilo, após 60 dias no meio de indução de calos.

Picloram ( $\mu\text{M}$ )	Hipocótilo		
	N6	MS	JADS
0	00,00 Abc	00,00 Ab	00,00 Ab
100	39,60 Aab	53,00 Aa	00,00 Bb
200	59,40 Aa	33,00 ABa	19,80 Bab
400	06,60 Abc	00,00 Ab	26,40 Aab
800	06,60 Bbc	26,40 ABab	39,60 Aa
CV (%) = 68,06			

Letras maiúsculas iguais na linha (entre os meios de cultivo), letras minúsculas iguais na coluna (entre as doses de Picloram), não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2021).

Para a variável analisada calo amarelo com oxidação, resultaram em interação dupla entre os fatores a (meios de cultivo x doses de Picloram) (Tabela 8). Para o meio N6, o tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de Picloram (53,00%) apresentou maior média em relação às outras concentrações da auxina no mesmo meio. A mesma dose de 100  $\mu\text{M}$  de Picloram aplicada ao meio JADS resultou na média de formação de 100% de calos amarelos com oxidação. O meio

MS, apresentou menores médias de formação de calos amarelos com oxidação em relação aos outros meios.

Tabela 8 – Média de calos amarelos com oxidação de *E. grandis* explante hipocótilo, após 60 dias no meio de indução de calos.

Picloram ( $\mu\text{M}$ )	Hipocótilo		
	N6	MS	JADS
0	00,00 Ab	00,00 Ab	00,00 Ac
100	53,00 Aa	19,00 Ba	100,00 Aa
200	13,20 Bb	33,00 ABa	73,20 Aab
400	00,00 Bb	26,40 Aa	46,60 Ab
800	00,00 Bb	00,00 Ba	59,40 Aab

CV (%) = 68,06

Letras maiúsculas iguais na linha (entre os meios de cultivo), letras minúsculas iguais na coluna (entre as doses de Picloram), não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2021).

Os resultados estatísticos mostram que a utilização do meio N6 com adição de 200  $\mu\text{M}$  de Picloram resultou numa média superior de formação de calos amarelos para folhas (tabela 3) e hipocótilos (tabela 7). Souza et al. (2016), trabalhando com linhagens de milho, obteve melhores resultados de formação de calos embriogênicos em meio N6 em comparação com o meio MS. O meio N6, tem em sua composição sulfato de amônio como fonte de  $\text{NH}_4^+$  em vez de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , forma utilizada no meio MS. Além disso o meio N6 possui maior concentração de nitrato de potássio do que o meio MS. Já comparando o meio MS com o JADS, a grande característica que os difere é sua maior concentração de Cálcio no meio JADS. A disposição desse nutriente no meio MS é o cloreto de cálcio, já no meio JADS é o nitrato de cálcio (FARIA et al., 2019).

Diferentes fontes do mesmo nutriente podem gerar diferentes respostas na célula vegetal devido à sua formulação química, que pode influenciar em sua absorção e em sua translocação no tecido vegetal (MOURA et al., 2019). Diferentemente de Moura et al. (2019), que trabalhando com o híbrido *E. urograndis* obteve melhores resultados na obtenção de calos friáveis utilizando JADS em comparação com o meio MS, no presente trabalho, o meio JADS não gerou resultados satisfatório na formação de calos amarelos.

Todos os tratamentos apresentaram calos oxidados ou calos amarelos com oxidação. Levando em conta que Moura et al., (2019) relatou que no híbrido *E. urograndis* a oxidação

do calo antecedeu a processo de formação de embriões, alguns calos oxidados e ou calos oxidados com estrutura branca foram mantidos e trocados para um meio de maturação.

### 3.1.3 Multiplicação e regeneração

Após 60 dias, os calos amarelos com aspecto friável ou semi-friável foram selecionados e transferidos para o meio de cultura N6 (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar), contendo 2 µM de Picloram (baseados em dados não publicados). Já os calos remanescentes, de coloração escura (oxidado) e/ou que apresentaram estruturas brancas, semelhantes ao aspecto embrionário, foram transferidos para o meio ½ MS (20 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g.L<sup>-1</sup> de ágar).

Normalmente, a indução de embriogênese somática pela alta concentração de auxina é seguida pela sua diminuição em um gradiente de concentração até sua completa ausência (MONTEIRO, 2013; CORREDOIRA et al., 2019).

As características de calos amarelos semi-friáveis foram mantidas ao serem transferidos para o meio N6 com adição de 2 µM de Picloram, como mostrada nas figuras 4 e 5.

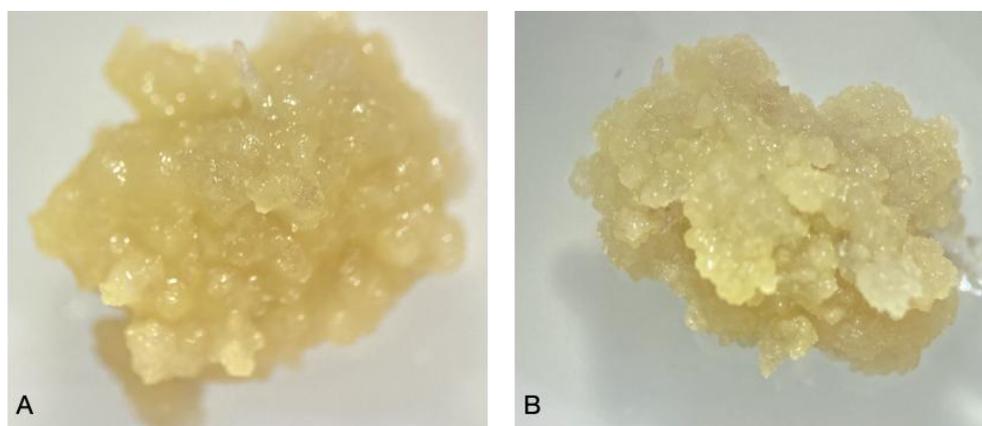


Figura 4 - Calo formado a partir de folha em meio de multiplicação N6 com adição de 2 µM de Picloram. Visualização em lupa com aumento de 0,65x (A) Calo vindo do meio MS 100 µM de Picloram; (B) Calo vindo do meio JADS 800 µM de Picloram

Fonte: Da autora (2021).

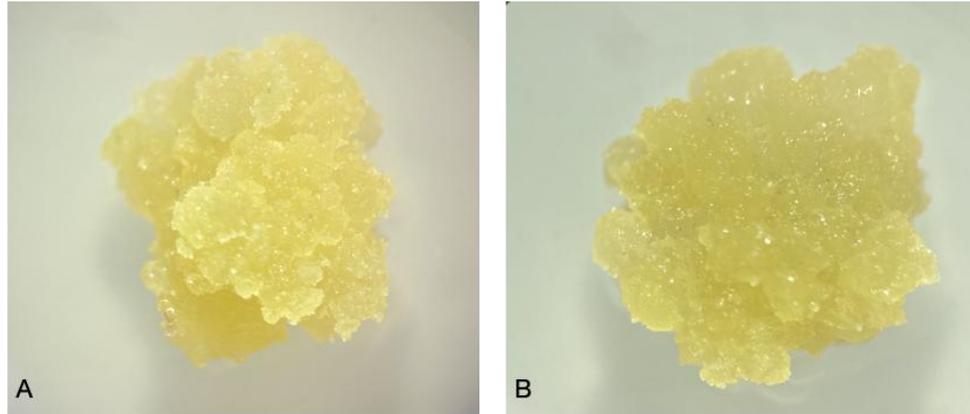


Figura 5 - Calo formado a partir de hipocótilo em meio de multiplicação N6 com adição de 2  $\mu\text{M}$  de Picloram. Visualização em lupa com aumento de 0,65x (A) Calo vindo do meio MS 200  $\mu\text{M}$  de Picloram; (B) Calo vindo do meio JADS 800  $\mu\text{M}$  de Picloram

Fonte: Da autora (2021).

Para os calos transferidos para o meio de regeneração  $\frac{1}{2}$  MS na ausência de reguladores de crescimento, observou-se a oxidação do tecido e/ou formação de raízes, muitas das vezes originadas das estruturas brancas formadas no calo oxidado (Figura 6).



Figura 6 - Calo formado a partir de hipocótilo em meio  $\frac{1}{2}$  MS. Visualização em lupa com aumento de 0,65x

Fonte: Da autora (2021).

### 3.1.4 Análise histológica

#### 3.1.4.1 Calos de *E. grandis* obtidos no meio N6

A embriogênese somática indireta em espécies do gênero *Eucalyptus*, é caracterizada pela proliferação de células desorganizadas (calo) antecedendo a formação de embriões. Diferentes autores têm considerado células meristemáticas como sinônimo de células

embriogênicas em função do compartilhamento de características, como tamanho reduzido, formato isodiamétrico, alta relação núcleo/citoplasma, vacúolos pequenos (TISSERAT et al., 1979; WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; FRAGA et al., 2015; CORREDOIRA et al., 2017). Neste estudo, era esperado que aos 60 dias obtivéssemos muitos cortes histológicos caracterizados como células meristemáticas, como obtidos em outros estudos (dados confidenciais), no entanto, foi possível observar que calos com 60 dias do explante hipocótilo de *E. grandis*, apresentaram uma grande quantidade de pró-embriões como podem ser visualizados na Figura 7.

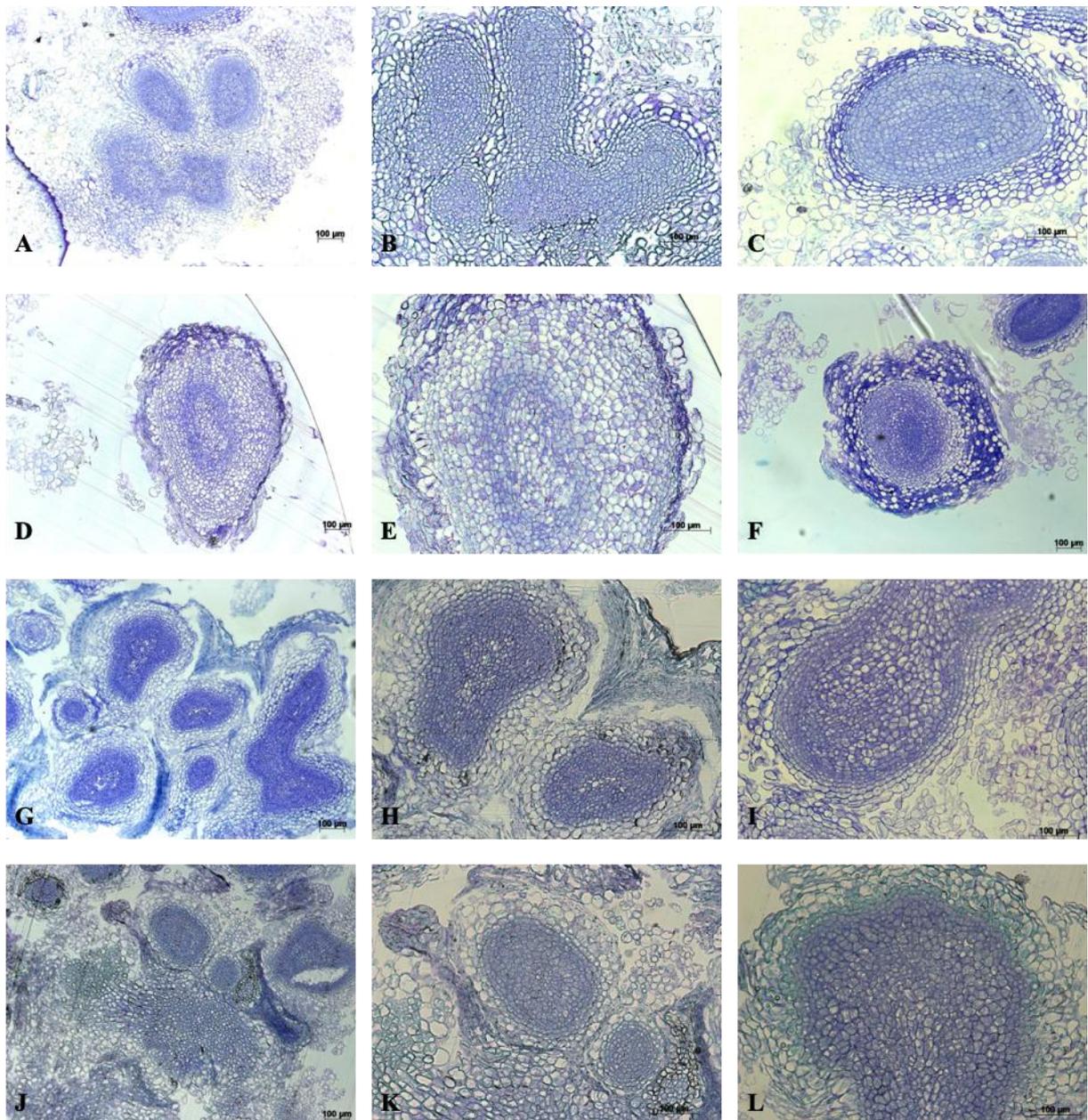


Figura 7 - Cortes histológicos de calos oriundos de folhas de *E. grandis* após 60 dias no meio de indução N6, em diferentes tratamentos. A-C: 100  $\mu$ M; D-F: 200 $\mu$ M; G-I: 400  $\mu$ M; J-K: 800  $\mu$ M.

Fonte: Da autora (2021).

Calos com 60 dias evidenciaram protuberâncias isolando-se completamente do tecido materno mediante fechamento completo da protoderme, o que caracteriza nítidos embriões somáticos em estágio globular (Figura 7 C, F, K). Esse tecido é considerado o primeiro que pode ser identificado histologicamente no processo de embriogênese (WEST; HARADA, 1993; YEUNG; RAHMAN; THORPE, 1996), bem como um pré-requisito para o desenvolvimento dos estádios embriogênicos posteriores (JONG et al., 1992). Houve diferenciação da protoderme, caracterizada por células dispostas de forma conjuntas, além do início da formação do procâmbio. Observa-se também, formação da estrutura bipolar, característica em embriões, com regiões de meristema apical caulinar e de meristema apical radicular (Figura 7 D).

Formação de embriões foram observadas em todos os tratamentos com Picloram no explante estudado folha, o que confirma que doses elevadas de auxinas são necessárias na embriogênese somática de *E. grandis*. Outro fator que deve ser considerado é a excelente resposta dessa espécie *E. grandis* na indução de calos e também pela presença de pró-embriões.

Para o explante hipocótilo, foram observados presença de células meristemáticas (Figura 8), no entanto, a presença de pró-embriões não ocorreu como observado no explante folha. Nos cortes do tratamento com 800  $\mu\text{M}$  de Picloram observou-se conjunto de células embriogênicas em intensa divisão celular em direção à protoderme (Figura 8 D-F).

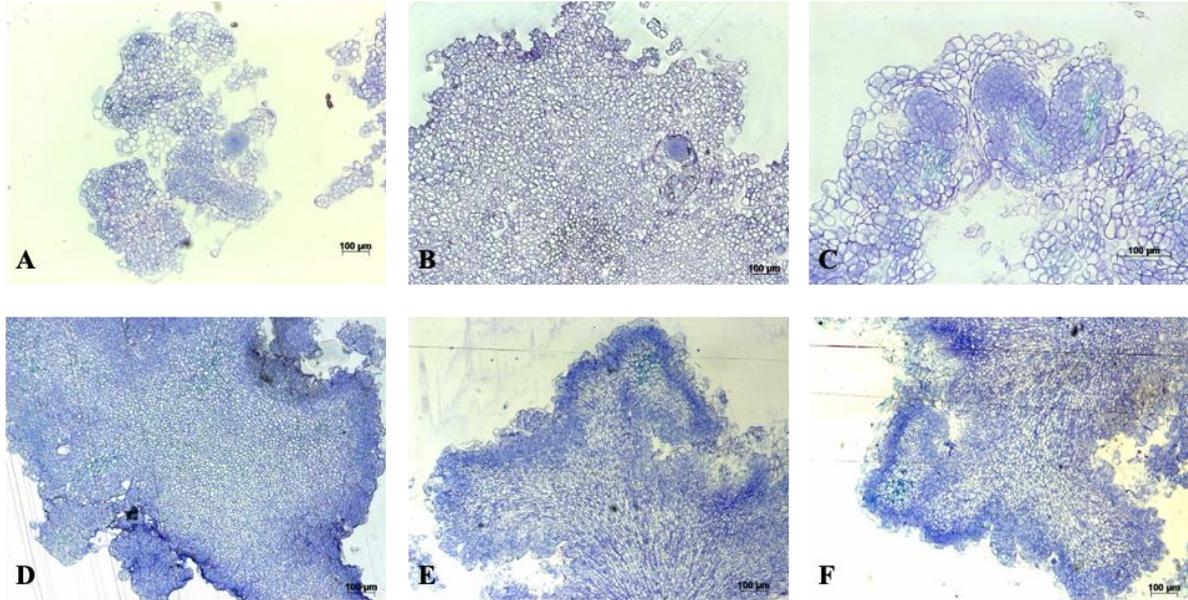


Figura 8 - Cortes histológicas de calos de hipocótilo de *E. grandis* após 60 dias no meio de indução N6, em diferentes tratamentos. A-C: 100  $\mu$ M; D-F: 800 $\mu$ M.

Fonte: Da autora (2021).

#### 3.1.4.2 Calos de *E. grandis* obtidos no Meio MS

O meio MS é o meio de cultivo mais estudado na embriogênese somática de eucalipto. Os calos obtidos no presente estudo no meio MS, apresentaram coloração amarela escura e a presença de oxidação (ver apêndice). Em algumas espécies não lenhosas, a oxidação dos calos provoca ausência do processo embriogênico e até a morte do explante (TAKAMORI et al., 2015). Em espécies lenhosas, como o *Eucalyptus*, tem-se observado que a oxidação dos calos embriogênicos é um processo que antecede a formação do embrião (MOURA, 2016).

Foram observadas presença de células meristemáticas e a formação de pró-embriões (Figura 9 D-F). Houve diferenciação da protoderme em alguns tratamentos oriundos do explante folha (Figura XX D-F).

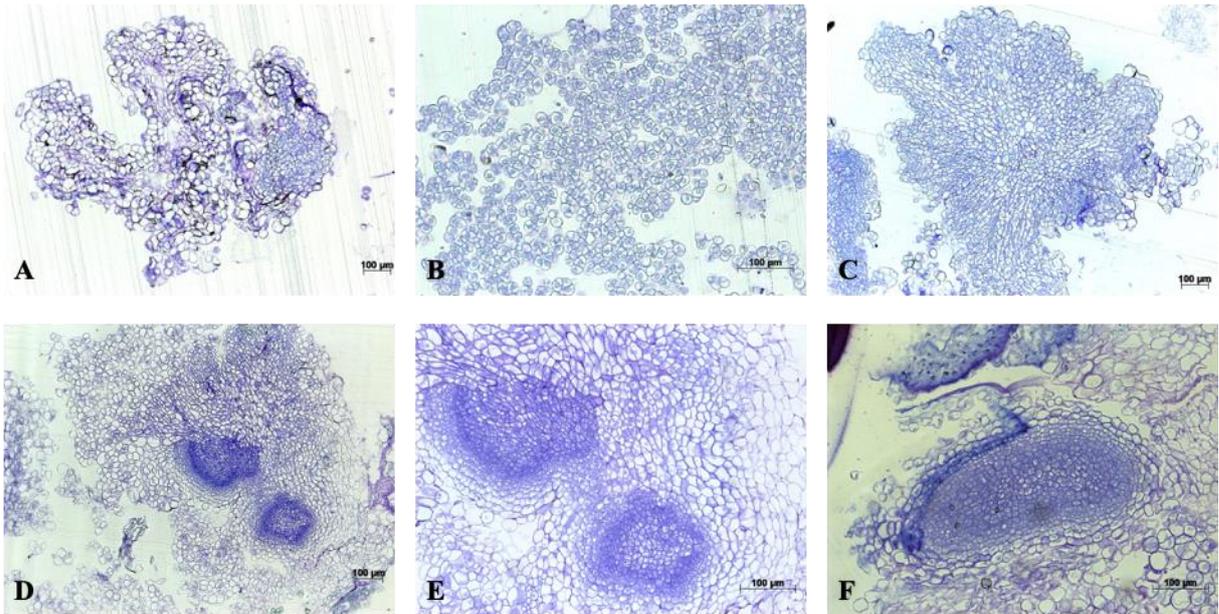


Figura 9 - Cortes histológicos de calos de folha de *E. grandis* após 60 dias no meio de indução MS, em diferentes tratamentos. A-C: 200 μM; D-F: 800μM.

Fonte: Da autora (2021).

Para o explante hipocótilo no meio MS, também foram observadas células meristemáticas (Figura 10) e formação de pró-embriões (Figura 10 A, B). Células embriogênicas e pró-embriões encontravam-se envolvidos por células parenquimáticas aparentemente em degradação. Essas células vacuoladas e com modificações na parede celular, podem servir como fonte de nutrientes para os pró-embriões em desenvolvimento (FRANSZ; SCHEL, 1991).

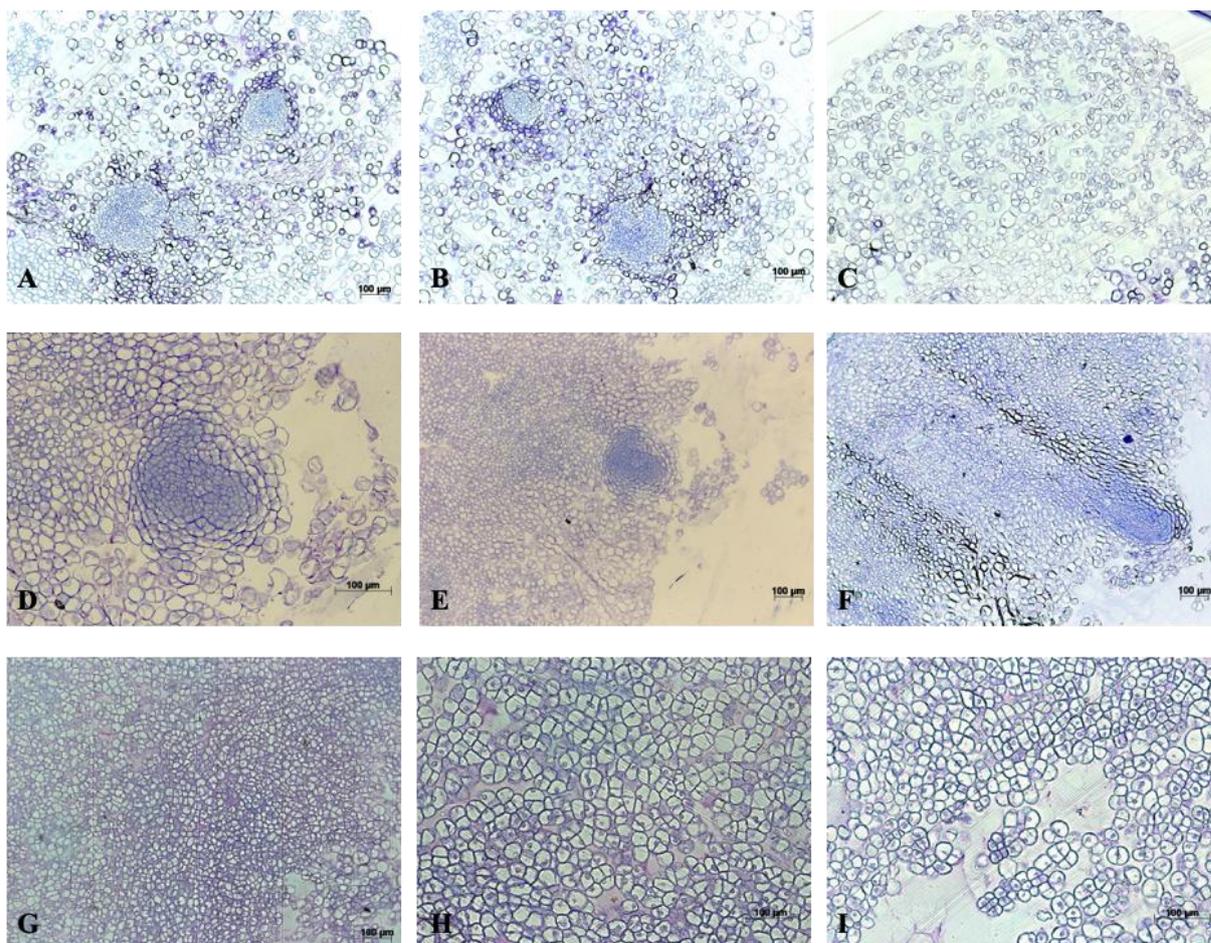


Figura 10 - Cortes histológicas de calos de hipocótilo de *E. grandis* após 60 dias no meio de indução MS, em diferentes tratamentos. A-C: 200  $\mu$ M; D-F: 400 $\mu$ M; G-I: 800  $\mu$ M.

Fonte: Da autora (2021).

### 3.1.4.3 Calos de *E. grandis* obtidos no Meio JADS

O meio JADS propiciou a formação de pró-embriões tanto no explante folha, como no explante hipocótilo (Figura 11; 12). Nesse tratamento, também foi verificado o fechamento completo da protoderme. No momento da coleta, foi observado que os calos presentes nos tratamentos desse meio apresentavam oxidação e presença de estruturas circulares brancas e presença de mucilagem.

No meio JADS foi possível observar escurecimento do meio, em função do contato do meio com os calos, ocasionado possivelmente por oxidação de compostos fenólicos. Apesar dos efeitos negativos ao cultivo *in vitro* dos produtos da oxidação de compostos fenólicos (NAZ; ALI; IQBAL, 2008; AHMAD et al., 2013), a sua presença em sistemas embriogênicos é recorrente na literatura (CORREDOIRA et al., 2017; GRANJA et al., 2018) com indícios de efeitos positivos nessa via morfogênica. No entanto, não está claro de que modo os compostos

fenólicos favorecem/promovem a embriogênese somática (REIS; BATISTA; CANHOTO, 2008).

Observaram-se áreas internas intensamente coradas e áreas periféricas vacuoladas e com células dispersas (consistência mucilaginosa) (Figura 11C). As regiões protodérmicas, exibem células embriogênicas (Figura 14A).

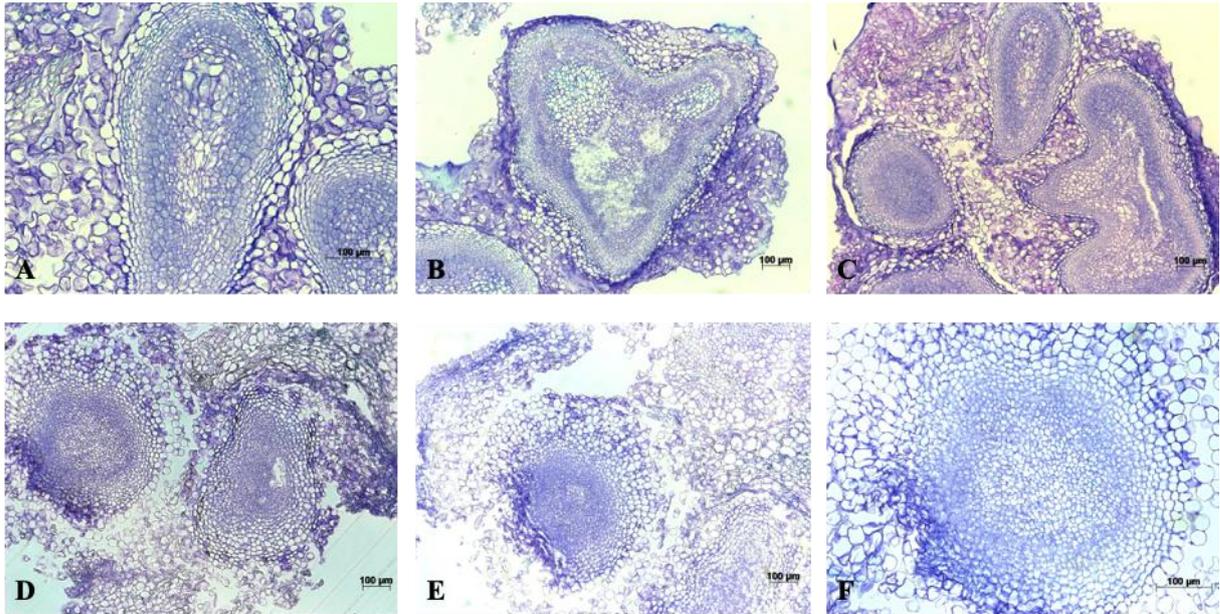


Figura 11 - Cortes histológicas de calos de folha de *E. grandis* após 60 dias no meio de indução JADS, em diferentes tratamentos. A-C: 200  $\mu$ M; D-F: 800 $\mu$ M.

Fonte: Da autora (2021).

Nas amostras dos tratamentos com hipocótilo, mostrou diferenciação da protoderme, formação da estrutura bipolar, característica em embriões, com regiões de meristema apical caulinar e de meristema apical radicular (Figura 12 D).

O aspecto viscoso, apresentando mucilagem nos calos em meio JADS, encontrados no momento da retirada das amostras para a análise histológica, podem estar relacionados com a compostos da parede celular vegetal, como os polissacarídeos da classe das pectinas, classificados frequentemente como mucilagens. As pectinas são polissacarídeos ácidos, que em solução aquosa apresentam a capacidade de produzir géis ou soluções altamente viscosas (SEYFRIED et al., 2016).

A presença marcante dessa mucilagem nos tratamentos com JADS, pode estar relacionada à alta concentração de Cálcio desse meio de cultura. O Cálcio forma um complexo ao se ligar com a pectina, dando firmeza à membrana vegetal. O teor inadequado de

cálcio nos tecidos pode ter sido causado pelo desbalanço entre pectina e cálcio resultando na aparência mucilaginosa vista nos calos (YAMAMOTO et al., 2011).

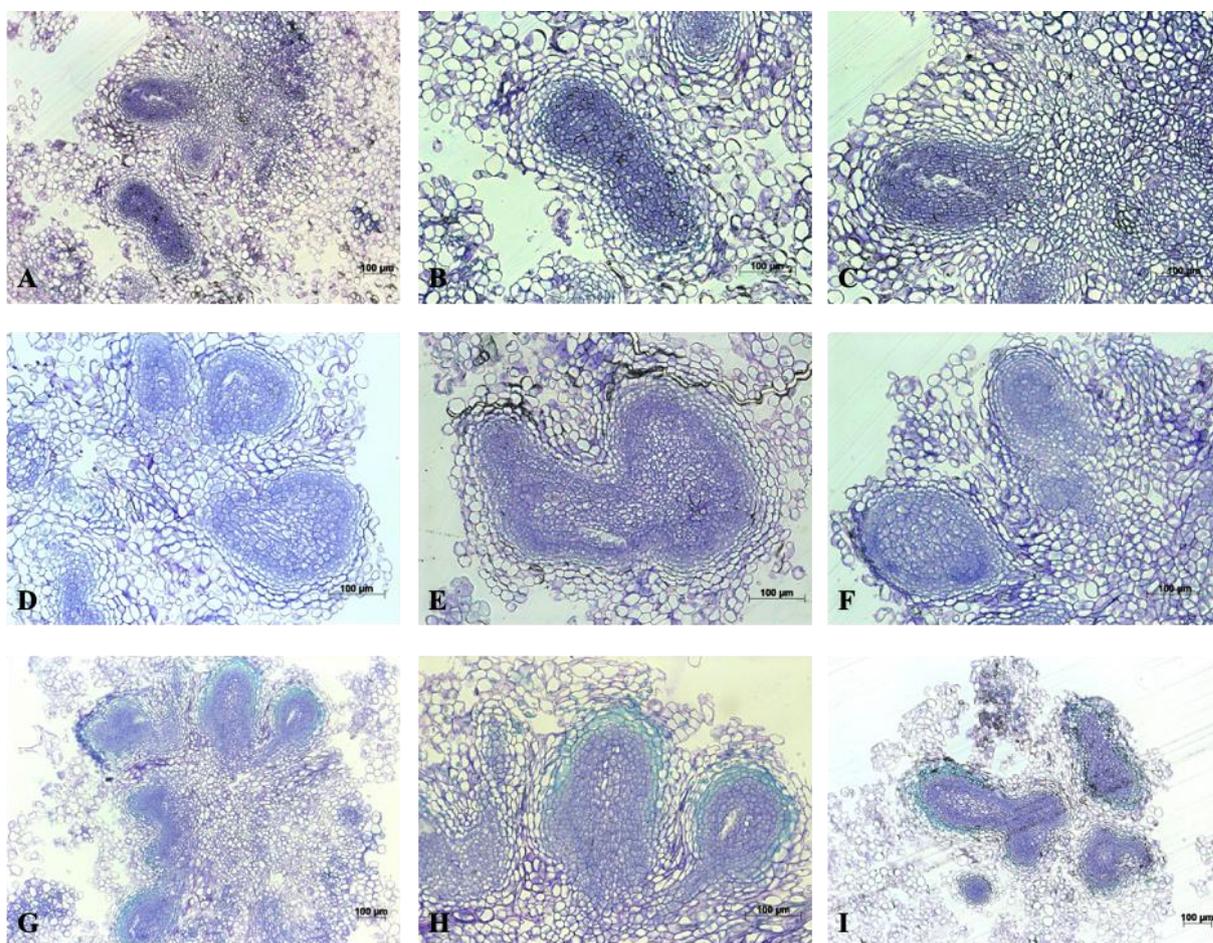


Figura 12 - Cortes histológicas de calos de hipocótilo de *E. grandis* após 60 dias no meio de indução JADS, em diferentes tratamentos. A-C: 100 µM; D-F: 200µM; G-I: 400 µM.

Fonte: Da autora (2021).

### 3.2 Teste 2

Como observado no teste 1, o meio N6 resultou em maiores médias de formação de calos amarelos. Em decorrência disso, um novo teste utilizando apenas o meio N6 foi feito. Repetiu-se as mesmas concentrações de Picloram utilizadas no teste 1.

Para a variável analisada calo amarelo intenso, os resultados mostraram que houve interação entre os fatores (explantes e doses Picloram) (Figura 11).

Tabela 9 – Porcentagem média de calos amarelos obtidos com os explantes hipocótilo e cotilédone com diferentes doses de Picloram.

Picloram (µM)	Folha	Hipocótilo
---------------	-------	------------

0	00,00 Aa	00,00 Ac
100	00,00 Aa	13,20 Abc
200	00,00 Ba	46,20 Aa
400	13,20 Ba	33,00 Aab
800	00,00 Aa	6,60 Abc
CV (%)	86,00	

Letras maiúsculas na linha minúscula (entre explantes) e minúsculas na coluna (entre doses de Picloram), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2021).

Os resultados mostraram que o meio N6 suplementado de 200  $\mu\text{M}$  gerou maior formação de calos amarelos para o explante hipocótilo (46,20%). Já para o explante folhas, a concentração de 400  $\mu\text{M}$  (13,20%) foi o único tratamento que gerou formação de calos amarelos. Esses resultados corroboram com Trevizam et al. (2011) que afirma que o órgão que serve como fonte de tecido, a idade fisiológica e ontogenética do órgão, o tamanho do explante e a qualidade da planta doadora são fatores que influenciam no comportamento do explante no meio de cultura.

### 3.3 Características morfológicas *versus* análises histológicas de calos de *E. grandis*

Para algumas espécies, as características morfológicas de calos embriogênicos já foram definidas, como, por exemplo, calos embriogênico de linhagens de milho tropical, de café e de dendê, sendo estes, calos de coloração amarelo de estrutura friável. Para outras espécies, como o pinus, os calos embriogênicos são definidos por apresentar coloração amarelo claro aquoso. No entanto, para se determinar essas características, faz-se necessário verificar seus aspectos morfológicos e histológicos, a fim então defini-lo como embriogênico. Em algumas espécies, a regeneração de embriões somáticos ocorre de maneira facilitada, não sendo necessário a etapa de análises histológicas.

Para a cultura do eucalipto, ainda não existe ou não está em domínio público um protocolo eficiente de embriogênese somática. Temos na literatura inúmeros trabalhos com o objetivo de obtenção de protocolo eficiente, entretanto, são apresentados como resultados somente a obtenção de calos embriogênicos, sem a regeneração final de uma planta completa de eucalipto. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se verificar que a embriogênese somática do eucalipto é um processo muito complexo e apenas a caracterização morfológica dos calos não garante eficiência na seleção de calos embriogênicos.

Neste estudo, foi possível obter calos amarelos semi-friáveis quando utilizado o meio N6, e as análises histológicas do explante folha evidenciaram a formação de embriões em todos os tratamentos estudados. Para o explante hipocótilo, nos tratamentos com o mesmo meio N6, as análises histológicas mostraram a presença de células meristemáticas e de células vacuoladas. Esses resultados reforçam que calos amarelos podem ser os calos mais indicados na embriogênese somática de *E. grandis*, no entanto, não foi possível obter a regeneração desses calos em planta. Esse resultado pode ser devido à longa permanência dos calos nas altas concentrações de picloram, sugerindo que, para futuros ensaios, seria interessante realizar testes de diferentes períodos em contato com a auxina, mantendo as mesmas dosagens.

Neste trabalho, foi possível verificar que calos com 60 dias em meio de indução, transferidos, posteriormente, para meio de multiplicação com 2  $\mu\text{M}$  de picloram, demonstrou ser eficiente na multiplicação, porém, pode ter prejudicado o desenvolvimento dos embriões e sua regeneração em plantas.

O meio MS foi considerado inferior aos demais meios testados, em relação à média de calos amarelos. Foi observado grande oxidação nesses calos, no entanto, nos resultados obtidos das análises histológicas do explante folha, o tratamento 200  $\mu\text{M}$  de picloram apresentou regiões com células meristemáticas, e o tratamento 800  $\mu\text{M}$  de picloram apresentou formação de estruturas semelhante a embrião. Resultado semelhante também foi encontrado no explante hipocótilo nos tratamentos 200, 400 e 800  $\mu\text{M}$  de picloram.

Calos obtidos em meio JADS, apresentaram oxidação e presença de mucilagem nos tratamentos estudados do explante folha e hipocótilo. Calos amarelos foram obtidos em um maior número de tratamentos do hipocótilo e as análises histológicas revelaram a presença de embriões em calos oriundos de folhas e hipocótilos cultivados no meio JADS.

#### **4 CONCLUSÃO**

Com base dos resultados da análise histológica e morfológica, pode-se levantar algumas hipóteses, a respeito da embriogênese somática de *E. grandis*:

- Os calos oriundos de hipocótilo e folha cultivados em meio N6 e JADS têm potencial para obtenção da embriogênese somática;
- O tempo dos explantes no meio de indução de calos deve ser reduzido para 30 e/ou 15 dias;

- Calos amarelos friáveis, calos amarelos semi-friáveis, calos amarelos com oxidação, calos oxidados e calos oxidados com estrutura branca e/ou com mucilagem devem ser utilizados em experimentos de maturação;

Novos estudos a respeito da embriogênese somática do eucalipto precisam ser feitos já que a fase de maturação e regeneração dos embriões não foi completamente elucidada, necessitando de protocolos que sejam reproduzíveis.

Ensaio utilizando carvão ativado, ácido abscísico, polietilenoglicol na maturação e GA<sub>3</sub> na germinação podem ser testados.

## REFERÊNCIAS

- ABIRI, R. *et al.* The Prospect of Physiological Events Associated with the Micropropagation of *Eucalyptus* sp. **Forests**. 11, 1211, 2020.
- CHU, C. *et al.* Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**. Vol XVIII, No 5. 1975.
- CORREDOIRA, E. *et al.* Initiation of leaf somatic embryogenesis involves high pectin esterification, auxin accumulation and DNA demethylation in *Quercus alba*. *Journal of Plant Physiology*, v. 213, p. 42-54, 2017.
- CORREDOIRA, E. *et al.* Non-Zygotic Embryogenesis in Hardwood Species. Taylor & Francis Group. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 2019. DOI: 10.1080/07352689.2018.1551122.
- CORREIA, D. *et al.* **Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro***. Piracicaba, SP. Projeto de pesquisa, ESALQ/USP, 1995. IPEF n.48/49, p.107-116, jan./dez.1995.
- DOBROWOLSKA, I.; ANDRADE, G. M.; CHAPMAN, D.; EGERTSDOTTER, U.; Histological analysis reveals the formation of shoots rather than embryos in regenerating cultures of *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 128, n. 2, p. 319-326, 20 out. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1111-5>.
- FARIA, D. V. *et al.* Wounding and medium formulation affect *de novo* shoot organogenic responses in hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 55, 277-289, 2019.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, dez. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1413-70542011000600001>.
- FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; PUTTKAMMER, C. C.; OLIVEIRA, E. M.; GUERRA, M. P. Time-lapse cell tracking reveals morphohistological features in somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze. *Trees*, v. 29, n. 5, p. 1613-1623, 2015.
- KENDURKAR, S. V.; RANGASWAMY, M.; *In vitro* approaches for the improvement of *Eucalyptus*. Springer International Publishing. **Biotechnologies of Crop Improvement**., v. 1, 2018.
- MONTEIRO, T. R.; **Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir do uso de meios de consistência líquida e de cultivos em suspensão**. Brasília: UnB, 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MOURA, L. C.; XAVIER, A.; CRUZ, A. C. F.; GALLO, R.; MIRANDA, N. A.; OTONI, W. C.; Auxin pulse in the induction of somatic embryos of *Eucalyptus*. **Revista Árvore**. 43(3):e430302, 2019.

MOURA, L. C., XAVIER, A., CRUZ, A. C. F., BATISTA, D. S., GALLO, R., MIRANDA, N. A., OTONI, W. C.; Effect of calcium, BAP and putrescine on somatic embryo induction in juvenile explants of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* hybrids. **Australian Journal of Crop Science**. n. 13, v.04, p. 513-519, 2019.

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

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, jun. 1964. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf01248568>.

PÁDUA, M. S.; BATISTA, T. R.; MNDONÇA, E. G.; STEIN, V. C.; PAIVA, L.; Morpho and Cytological Differentiation of Calli of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* During Somatic Embryogenesis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 14 nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018170043>.

PAIS, M. S.; Somatic Embryogenesis Induction in Woody Species: The Future After OMICS Data Assessment. **Frontiers in Plant Science**. 10:240, 2019.

SHWE, S.; LEUNG, D. W. M.; Plant regeneration from *Eucalyptus bosistoana* callus culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 56, n. 5, p. 718-725, 2 jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10093-w>.

SOUZA, R. A. V. *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration from an elite tropical maize inbred line. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 3, 2016.

SILVA, D. P. C *et al.* Somatic embryogenesis of *Byrsonima intermediai* A. Juss.: induction and maturation via indirect approach. **Plant cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**. 133:115-122, 2018.

TAKAMORI, L. *et al.* Optimization of somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration of *Urochloa* species using picloram. **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, v. 51, p. 554–563, 2015.

TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, n. 119, p. 1275-1283, 1979.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y.; Efeito dos Reguladores de Crescimento Dicamba e Picloram na Embriogênese Somática em *Eucalyptus grandis*. Sociedade de Investigações Florestais. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.3, p.417-426, 2007.

TORRES, K. C.; Overview of Cell Suspension Culture. **Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops**. Van Nostrand Reinhold, 1989.

TREVIZAM, R.; BRONDANI, G. E.; NERY, F. U.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M.; Caracterização morfológica de calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake sob concentrações de boro e cálcio. **CERNE**. v. 16, n. 2, pp 215-222. Abril, 2011. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=74418601009>

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

### **CAPÍTULO 3**

## **MEIO N6 NA INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E SUSPENSÃO CELULAR DE *E. urograndis***

## RESUMO

A indução de calos embriogênicos é uma das principais etapas no processo de embriogênese somática. Vários são os fatores que afetam a indução de culturas embriogênicas: tipo do explante, estágio de desenvolvimento, condições fisiológicas da planta matriz, composição e balanço hormonal do meio de cultura, genótipo da planta, dentre outros. O objetivo desse estudo foi avaliar o meio N6 e diferentes concentrações de Picloram na indução de calos embriogênicos de eucalipto, bem como otimizar a suspensão celular. Neste estudo foi utilizado como explante, o hipocótilo de *E. urograndis* oriundos de plântulas com 30 dias de idade. O meio de indução foi o meio N6 sais e vitaminas, com diferentes concentrações de Picloram (0, 100, 200, 400 e 800  $\mu\text{M}$ ). Após 60 dias no meio de indução, foram avaliados a porcentagem de formação de calos, presença de calos amarelos intensos semi-friável, calo amarelo aquoso e calo amarelo com oxidação. Após a obtenção dos calos, foi iniciada uma suspensão celular foi iniciada utilizando o meio N6M5. Foram realizados testes de regeneração dos calos embriogênicos e da suspensão celular, em meio de sinalização (ABA e PEG em diferentes combinações) e a maturação com diferentes fontes de carbono (sacarose e maltose). O meio N6 se mostrou eficiente na indução de calos de *E. urograndis*. Calos semi-friáveis de coloração amarela intensa obtidos no meio N6 com 400  $\mu\text{M}$  de picloram, e a suspensão celular obtida apresentaram potencial embriogênico. Não foi observado presença de embriões em nenhum dos tratamentos de regeneração estudados. Novos testes de regeneração devem ser realizados com os calos e a suspensão de *E. urograndis*.

**Palavras-chave:** Cultura de Tecidos. Calogênese. Regulares de Crescimento. Auxina. Regeneração.

## 1 INTRODUÇÃO

A aplicação da biotecnologia tornou-se de extrema importância para a indústria florestal, pois acelera o processo de melhoramento genético, através do uso de técnicas como, marcadores moleculares, cultura de tecidos e a engenharia genética. A embriogênese somática tem sido apontada como tecnologia promissora na clonagem de eucalipto, visto que apresenta potencial para ser usada na propagação massal de genótipos selecionados e como técnica básica para auxiliar programas de transformação genética (KENDURKAR & RANGASWAMY, 2018).

Reguladores de crescimento, principalmente as auxinas, são os aspectos mais investigados na indução de embriogênese somática em *Eucalyptus* sp., sendo as auxinas mais empregadas o 2,4-D, o Dicamba e o Picloram (PAIS, 2019). A presença de altas concentrações de auxina têm sido apontada como gatilho inicial na aquisição de competência embriogênica (FEHÉR, 2015). Entre os meios de cultivo testados para a embriogênese somática de eucalipto, o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) é o mais utilizado. O elemento chave deste meio nutritivo é a presença de elevados níveis de nitrogênio na forma de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) que tem se mostrado benéfico para a indução de embriogênese somática para algumas culturas. No entanto, percebe-se que ainda existe uma carência de metodologia eficiente e reprodutível para a cultura do eucalipto, uma vez que na maioria dos casos se relata grande oxidação e rizogênese dos calos, bem como, baixa taxa de obtenção de embriões normais com capacidade a serem convertidos em plantas.

Linhagens de milho que apresentaram recalcitrância *in vitro* como é o caso do eucalipto, apresentaram melhoria na indução de calos embriogênicos quando se utilizou o meio basal N6 (CHU et al., 1975) em comparação com o meio MS (SOUZA et al. 2016). A maior diferença existente entre estas duas formulações de meio é seu conteúdo em nitrogênio inorgânico, o meio basal MS possui 3,03 e 1,4 vezes mais  $\text{NH}_4$  e  $\text{NO}_3$ , respectivamente, do que o meio N6. Ainda não existem relatos do uso do meio N6 na embriogênese somática de eucalipto.

Uma estratégia que pode ser empregada na embriogênese somática após a obtenção de calos embriogênicos é a multiplicação em larga escala através do estabelecimento de suspensões celulares (GUERRA et al., 1999). Em alguns casos, a taxa de proliferação de células embriogênicas é maior e as culturas tornam-se mais sincronizadas, pois as células desenvolvem-se como estruturas separadas e podem ser separados facilmente (VON ARNOLD et al., 2002).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi testar o meio N6 sais e vitaminas na indução de calos embriogênicos de *E. urograndis*, bem como o estabelecimento de suspensões celulares a partir de calos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção e multiplicação dos calos embriogênicos

Para obtenção dos calos embriogênicos foram utilizados como explantes, hipocótilos de plântulas de *E. urograndis* germinadas in vitro com 30 dias. Os hipocótilos foram seccionados com tamanho de 0,2 - 0,3 mm e colocados em contato com o meio de indução que continha o meio N6 sais e vitaminas (CHU et al. 1975), acrescido de 50 mg.L<sup>-1</sup> de L-cisteína, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, diferentes concentrações de Picloram (0; 100; 200; 400; 800 µM) e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C. As placas foram fechadas com filme PVC e incubadas no escuro em sala de crescimento com temperatura de 27°C por 60 dias.

O delineamento utilizado para esse experimento foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. Cada repetição foi composta de três fragmentos de hipocótilo. As variáveis analisadas foram porcentagem de total de calos, calos amarelo intenso, calo amarelo claro e calo amarelo com oxidação. O software utilizado foi o SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2008).

Após 60 dias, os calos foram transferidos para o mesmo meio, com a concentração de Picloram reduzida para 10 µM. Calos com 90 dias foram submetidos a análise histológica. Após 90 dias, os calos foram transferidos para o mesmo meio, com a concentração de Picloram reduzida para 2 µM, sendo este denominado de meio de multiplicação de calos, sendo repicados a cada 30 dias.

### 2.2 Suspensão celular

Para instalação da suspensão celular, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 25 mL, com 7,5 mL de meio líquido N6M5 (A composição do meio N6M5: Meio N6 sais e vitaminas, 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg.L<sup>-1</sup> de L-glutamina, 10 mg.L<sup>-1</sup> biotina, 2 µM de Picloram, 1000 µM de putrescina, 10 mg.L<sup>-1</sup> ácido ascórbico; pH 5,3).

O meio N6M5 foi formulado em referência aos meios líquidos utilizados na suspensão celular de banana que incluem L- glutamina e biotina, assim como agentes antioxidantes como ácido ascórbico (MORAIS-LINO et al., 2008).

Após autoclavagem do meio N6M5, foram adicionados ao meio a putrescina e o ácido ascórbico que foram filtro-esterilizados. Foram transferidos aproximadamente 150 mg de calos ao meio N6M5. Os frascos ficaram sob agitação em 110 rpm no escuro em sala de crescimento com temperatura de 27°C.

Após 14 dias, a suspensão foi filtrada com auxílio de peneira de inox - malha 0,5 mm para a retirada de estruturas maiores que apresentavam oxidação. A suspensão filtrada foi transferida para frascos Erlenmeyer de 50 mL, com 15 mL de novo meio líquido N6M5, mantidas sob agitação em 110 rpm no escuro em sala de crescimento com temperatura de 27°C.

Após o período de 30 dias da suspensão estabelecida, a mesma foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL, com 30 mL de meio líquido N6M5, nas mesmas condições anteriores. Foram realizadas análises histológicas após 60 dias da suspensão celular sedimentada.

### **2.2.1 Análises histoquímicas**

As amostras coletadas para a análise histológica foram fixadas em FAA 50% (10% de solução de formaldeído 40% + 5% de ácido acético glacial + 50% de álcool etílico, v/v) por 24 horas sob temperatura ambiente e depois desidratadas em série etílica a 70, 80, 90 e 100% por 1 hora cada, repetindo a série etílica de 100% mais uma vez. As amostras foram infiltradas durante 24 horas com solução 1:1 de resina epóxi (Historesin® Leica) e etanol e depois 24 horas em resina pura. Após infiltração, as amostras foram emblocadas na proporção 15:1 de resina e polimerizador e mantidas na estufa a 35°C por 48h. Cortes com espessura de 5 µm foram realizados em micrótomo (Easypath EP-31-20091), corados com solução de azul de Toluidina a 0,05% (O'BRIEN et al., 1965) e visualizados em microscópio de luz (Zeiss, Axio Scope) e selados com *Entellan*®.

Para o teste de dupla coloração com carmim acético (CA) e azul de Evans (AE) visando a confirmação da existência de células embriogênicas, utilizou-se suspensão celular sedimentada após 60 dias em meio líquido N6M5. Coletou-se 1 mL de suspensão celular e adicionou 200 µL de CA (2%), deixando agir por 1 minutos e, em seguida, lavou-se o material com água destilada, para retirar o excesso do corante. Em seguida, adicionou-se ao

material 100  $\mu\text{L}$  de AE (0,1%) por 30 segundos, repetindo o processo de lavagem do material com água destilada para a retirada do excesso de corante, conforme metodologia adaptada de Valente (2007) e Reis (2010).

As fotomicrografias foram obtidas a partir de câmera digital acoplada em microscópio óptico (*Zeiss, Axio Scope*) utilizando o sistema de captura de imagem *AxioVision 4.8*.

### 2.3 Regeneração dos calos em meio semissólido

Nesse teste de regeneração foram utilizadas suspensões celulares obtidas no meio N6M5 e calos de *E. urograndis* obtidos na etapa de indução que estavam no meio de multiplicação.

As suspensões foram passadas em peneira de malha 0,5 mm e, aproximadamente, 3 mL de células sedimentadas da suspensão foram diluídas em 50 mL de meio líquido N6 sais e vitaminas com 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e pH 5,8. Em seguida, cada placa de Petri (tratamentos) receberam um disco de malha e 0,5 mL de suspensão diluída.

Nesse teste, a suspensão e os calos foram inoculados primeiro no meio denominado ‘meio de sinalização’ (Meio N6 sais e vitaminas; 60  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose; 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de mio-inositol; 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão; pH 5,8; 7  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar, com diferentes combinações de ABA (50,100 e 150  $\mu\text{M}$ ) e PEG (25  $\text{g.L}^{-1}$ ).

Os tratamentos dos meios de sinalização, por 15 dias, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Combinação dos tratamentos aplicados no meio de sinalização.

Tratamentos	Combinação ABA x PEG
T1	Controle sem ABA e sem PEG
T2	13,15 $\text{mg.L}^{-1}$ de ABA (50 $\mu\text{M}$ )
T3	26,31 $\text{mg.L}^{-1}$ de ABA (100 $\mu\text{M}$ )
T4	39,46 $\text{mg.L}^{-1}$ de ABA (150 $\mu\text{M}$ )
T5	00,00 $\text{mg.L}^{-1}$ de ABA + 25 $\text{g.L}^{-1}$ de PEG 6000
T6	13,15 $\text{mg.L}^{-1}$ de ABA + 25 $\text{g.L}^{-1}$ de PEG 6000
T7	26,31 $\text{mg.L}^{-1}$ de ABA + 25 $\text{g.L}^{-1}$ de PEG 6000
T8	39,46 $\text{mg.L}^{-1}$ de ABA + 25 $\text{g.L}^{-1}$ de PEG 6000

Fonte: Da autora (2021).

Após 15 dias no meio com ABA e/ou PEG 6000, tanto os calos como as células da suspensão foram transferidos para diferentes meios de maturação, testando diferentes concentrações de sacarose e maltose (Meio N6 sais e vitaminas (CHU et al., 1975); 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol; pH 5,8; 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Tratamentos aplicados: T1: 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, T2: 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, T3: 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, T4: 30 g.L<sup>-1</sup> de maltose, T5: 60 g.L<sup>-1</sup> de maltose, T6: 90 g.L<sup>-1</sup> de maltose.).

As avaliações foram realizadas após 60 e 90 dias de cultivo no meio de maturação para verificar a presença e a contagem de possíveis embriões.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Obtenção de calos embriogênicos

Na indução de calos, foram obtidas massas celulares de estrutura aquosa a semi-friável (Figura 1). O calo friável é o mais adequado para iniciar culturas em suspensão, comparado ao calo compacto, pois as células se apresentam desconectadas uma das outras, com a ausência de elementos vasculares e intercaladas com espaços intercelulares (FRANSZ, CHEL, 1991).

Foi observado a indução de calos nos hipocótilos em todos os tratamentos contendo Picloram a partir do décimo dia. Diferentemente, no tratamento controle ocorreu oxidação dos explantes, não havendo formação de calos.

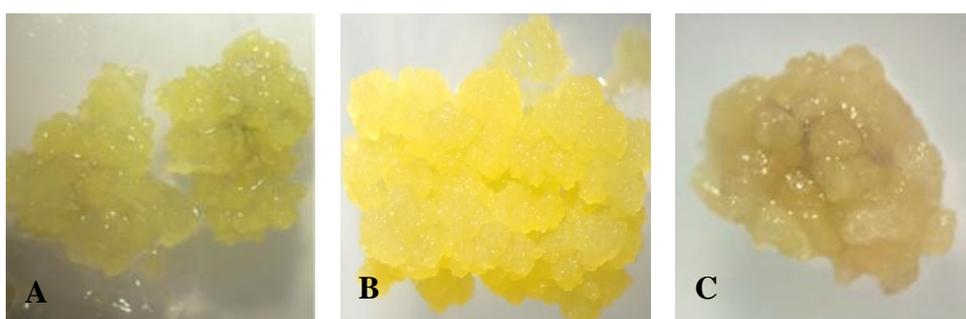


Figura 1 - Calos obtidos a partir de hipocótilo de *E. urograndis*, no meio de indução N6 com 60 dias. (A) Calo amarelo claro aquoso; (B) Calo amarelo intenso semi-friável; (C) Calo amarelo com oxidação.

Fonte: Da autora (2021).

Após 60 dias de cultivo, para a variável formação de calos (Tabela 2), foi observado uma redução na indução de calos conforme se aumentou as concentrações da auxina.

Tabela 2 – Porcentagem de calos obtidos após 60 dias no meio de indução N6 com diferentes concentrações de Picloram

Picloram ( $\mu\text{M}$ )	Formação de calos	Calo amarelo intenso	Calo amarelo claro	Calo amarelo com oxidação
0	00,00 b	00,00 b	00,00 c	00,00 b
100	86,80 a	13,20 ab	73,20 a	00,00 b
200	80,20 a	19,80 ab	59,80 ab	00,00 b
400	80,20 a	33,00 a	13,20 bc	33,00 a
800	60,40 a	33,00 a	6,60 c	19,80 a
CV (%)	45,77	42,93	48,54	46,48

Letras minúsculas iguais na coluna (entre as doses de Picloram), não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2021).

As concentrações de 100, 200 e 400  $\mu\text{M}$  de Picloram apresentaram as maiores médias de formação de calos (86,80%, 80,20%, 80,20%, respectivamente), seguidos da concentração de 800  $\mu\text{M}$  de Picloram, que apresentou média de formação de calos de 60,40% (Tabela 2).

Para a variável calo amarelo intenso, as concentrações de 400 e 800  $\mu\text{M}$  de Picloram apresentaram os melhores resultados (33%), seguidos de 19,80% e 13,20% para as concentrações de 200  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  (Tabela 2).

Para a variável calo amarelo claro, 100 e 200  $\mu\text{M}$  de Picloram apresentaram as melhores médias (73,20% e 59,80%, respectivamente) (Tabela 2).

Os tratamentos com as doses mais elevadas de Picloram (400 e 800  $\mu\text{M}$ ) apresentaram calo amarelo com oxidação, obtendo 33% e 19,80%, respectivamente (Tabela 2).

Após 90 dias, a linhagem “calo amarelo intenso”, obtidos no tratamento contendo 400  $\mu\text{M}$  de Picloram, apresentaram características homogêneas - coloração amarela e estrutura semi-friável, em relação aos demais tratamentos estudados. Este tratamento de indução foi o único em que os calos de *E. urograndis* multiplicaram sem apresentar oxidação ou mudança na sua estrutura.

A análise histológica nos calos de *E. urograndis* (Meio N6 + 400  $\mu\text{M}$  de Picloram) apresentaram células meristemáticas, núcleo e nucléolo evidentes e presença de células vacuoladas (Figura 2). Células vegetais podem adquirir competência em diferentes estádios de exposição do tecido ao meio de cultura acrescido de reguladores de crescimento. Quando

adquirem novamente atividade meristemática, estas são chamadas de células competentes (ROCHA et al., 2012), estabelecendo, dessa forma, competência para se diferenciar em embriões.

No presente estudo, foi utilizado como explante hipocótilos de plantas com 30 dias, e os resultados revelaram que esse explante se mostrou eficiente na obtenção de calos com potencial embriogênico.

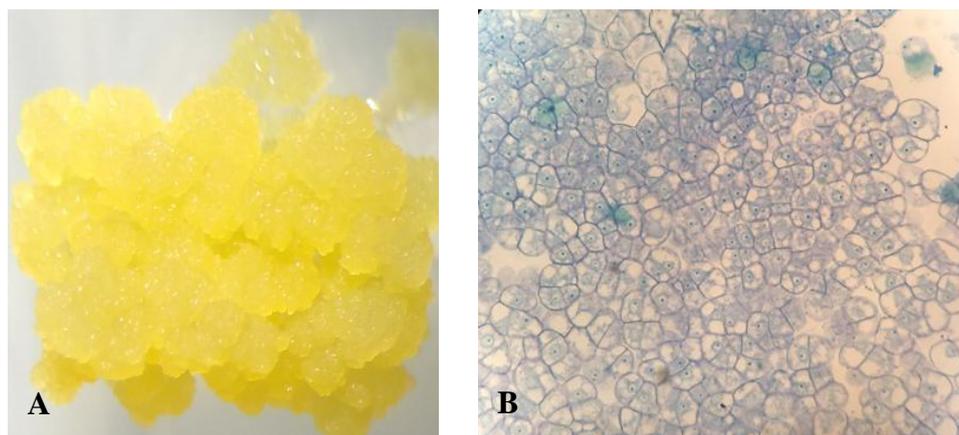


Figura 2 - (A) Calo de *E. urograndis* com 60 dias; (B) análise histológica (50x), presença de regiões meristemáticas, e células em divisão.

Fonte: Da autora (2021).

### 3.2 Suspensão celular de *E. urograndis*

Calos de *E. urograndis* com 90 dias oriundos do tratamento N6 + 400  $\mu$ M de Picloram e após análise histológica, foram utilizados para dar início a suspensão celular. Os calos semi-friáveis se desintegraram no meio líquido sem a necessidade de maceração dos mesmos. As trocas de meios foram realizadas inicialmente a cada 30 dias, no entanto, por causa da oxidação ocorrida em alguns frascos, as trocas de meio foram antecipadas primeiramente para 21 dias, e depois a cada 15 dias.

Após 60 dias do início da suspensão celular em meio N6M5, foi possível verificar a ocorrência de células que mantiveram a coloração inicial do calo (calo amarelo intenso) e uma estrutura granular muito homogênea. Segundo Jalil et al. (2003), a pigmentação amarelada indica o caráter embriogênico das células em suspensão, que foi atestado por posteriores análises histoquímicas.

O crescimento celular ocorreu de forma intensa e, na Figura 3-B, é possível verificar que a quantidade celular no momento da troca (aproximadamente 1 mL de suspensão

celular sedimentada) não preenchia o fundo do frasco, e após 15 dias a quantidade de células foi quase 10 vezes maior (Figura 3-D).

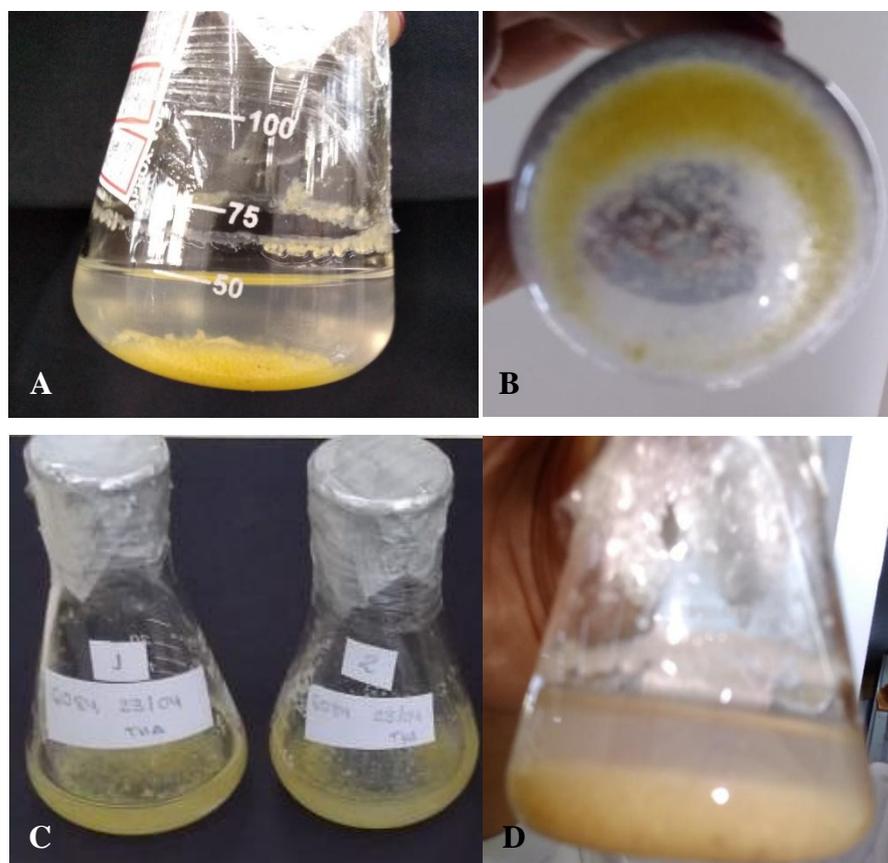


Figura 3 - Suspensão celular de *E. urograndis* em meio N6M5.  
Fonte: Da autora (2021).

De um frasco pode-se obter aproximadamente 10 novos frascos. Quando comparado com a multiplicação de calos em meio semissólido, as suspensões celulares exibem alta taxa de divisão celular (GUREL et al. 2002), permitindo assim esse crescimento acelerado que é devido ao contato direto das células com os nutrientes do meio (LOYOLA-VARGAS & VAZQUÉS-FLOTA, 2006), conforme observado na suspensão celular de eucalipto.

A ação da putrescina na indução de pró-embriões somáticos foi relatada como positiva em explante juvenil de *Eucalyptus grandis* x *E. uroplhyla* (MOURA et al., 2016). Na embriogênese somática do dendê, a putrescina na concentração de 1000  $\mu$ M foi eficiente na proliferação e regeneração de embriões somáticos (CORRÊA et al., 2016).

Essas poliaminas têm funções de regulação de processos fisiológicos durante a divisão celular (AHMAD et al., 2012), e têm sido estudadas como reguladores de crescimento em cultura de tecidos, bem como compostos de redução do estresse nas plantas (REIS et al.,

2016). O efeito das poliaminas, principalmente da putrescina, sobre a embriogênese somática tem sido descrito para várias espécies (KEVERS et al., 2002; SAKHANOKHO et al., 2005; SILVEIRA et al., 2006; MALABADI & NATARAJA, 2007; NIEVES et al., 2008; WU et al., 2009; SILVEIRA et al., 2013; RAJESH et al., 2014).

Nesse estudo, a putrescina no meio líquido promoveu multiplicação e homogeneidade das células, bem como inibiu a formação de raízes em estágios posteriores a suspensão em comparação com outros meios testados anteriormente (dados não publicados).

### **3.3 Análise histológica e teste de dupla coloração da suspensão celular de *E. urograndis***

As suspensões apresentaram características embriogênicas, tais como células pequenas e isodiamétricas (Figura 4), formando massas pró-embriogênicas, apresentando núcleo e nucléolo proeminente e citoplasma denso. Em algumas células foi possível a visualização de células em divisão, indicando multiplicação celular ativa.

O teste de dupla coloração com os corantes carmim acético (CA) e Azul de Evans (AE) possibilita a diferenciação de culturas embriogênicas. Esse teste fornece informações importantes sobre a qualidade da suspensão (STEINER et al. 2005). As massas pró-embriogênicas apresentam dois grupos de células, o primeiro é formado por células isodiamétricas, pequenas e com citoplasma denso, e são reativas ao corante CA, resultando em coloração vermelha. O outro grupo é formado por células não embriogênicas, vacuoladas e permeáveis ao AE, resultando em coloração azul. Os resultados obtidos nesses estudos mostraram a forte reação da massa celular reagindo ao Carmim-acético e apresentando a coloração vermelha, característica de massas pró-embriogênicas, sendo um bom indicativo da competência e viabilidade da suspensão celular de eucalipto.

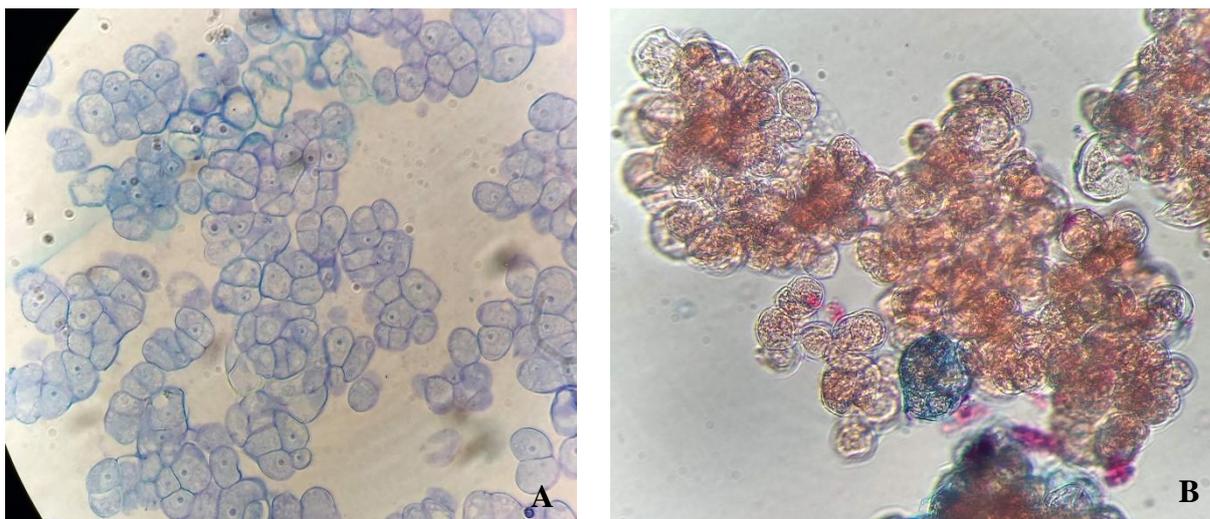


Figura 4 - Suspensão celular de *E. urograndis* em meio N6M5. (A) Corte histológico; (B) teste de dupla coloração – forte reação ao Carmim acético. Aumento de 50x.

Fonte: Da autora (2021).

### 3.4 Regeneração e Maturação

#### 3.4.1 Suspensões celulares

As suspensões ficaram 15 dias em meios semissólidos em diferentes combinações de ABA e PEG 6000 e, posteriormente, foram transferidas para meios de maturação, com sacarose ou maltose. Após 60 dias nos meios de maturação, as estruturas celulares da suspensão cresceram e apresentaram aspecto uniforme, conforme pode ser visualizado pela Figura 5.

De todos os tratamentos deste teste, somente essas duas características foram observadas, células com coloração amarela (Figura 5. A, B) e com coloração branca (Figura 5. C, D), após 60 dias de cultivo. Entretanto, para as avaliações aos 90 e 120 dias, foram observados crescimento e oxidação das células, não havendo formação de embriões em nenhum dos tratamentos testados.

Nas condições analisadas, as células de formato isodiamétrico que apresentaram reação ao CA, não foram competentes para a diferenciação em embriões. De acordo com George et al. (2008), para haver a proliferação das massas pró-embriogênicas, um suprimento de auxina é exigido, sendo que, após o período de indução da embriogênese, a fonte de auxina é reduzida ou eliminada por completo do meio de cultivo, podendo, assim, os embriões iniciar o seu desenvolvimento. Neste trabalho, a redução da auxina Picloram a concentrações baixas, como 2  $\mu\text{M}$  na multiplicação de calos e na suspensão, e a retirada da auxina nos meios de maturação, aparentemente não contribuíram para a conversão em embriões. O tratamento

controle, sem ABA ou PEG, não apresentou diferenças em relação aos tratamentos aplicados com diferentes concentrações dessas substâncias.

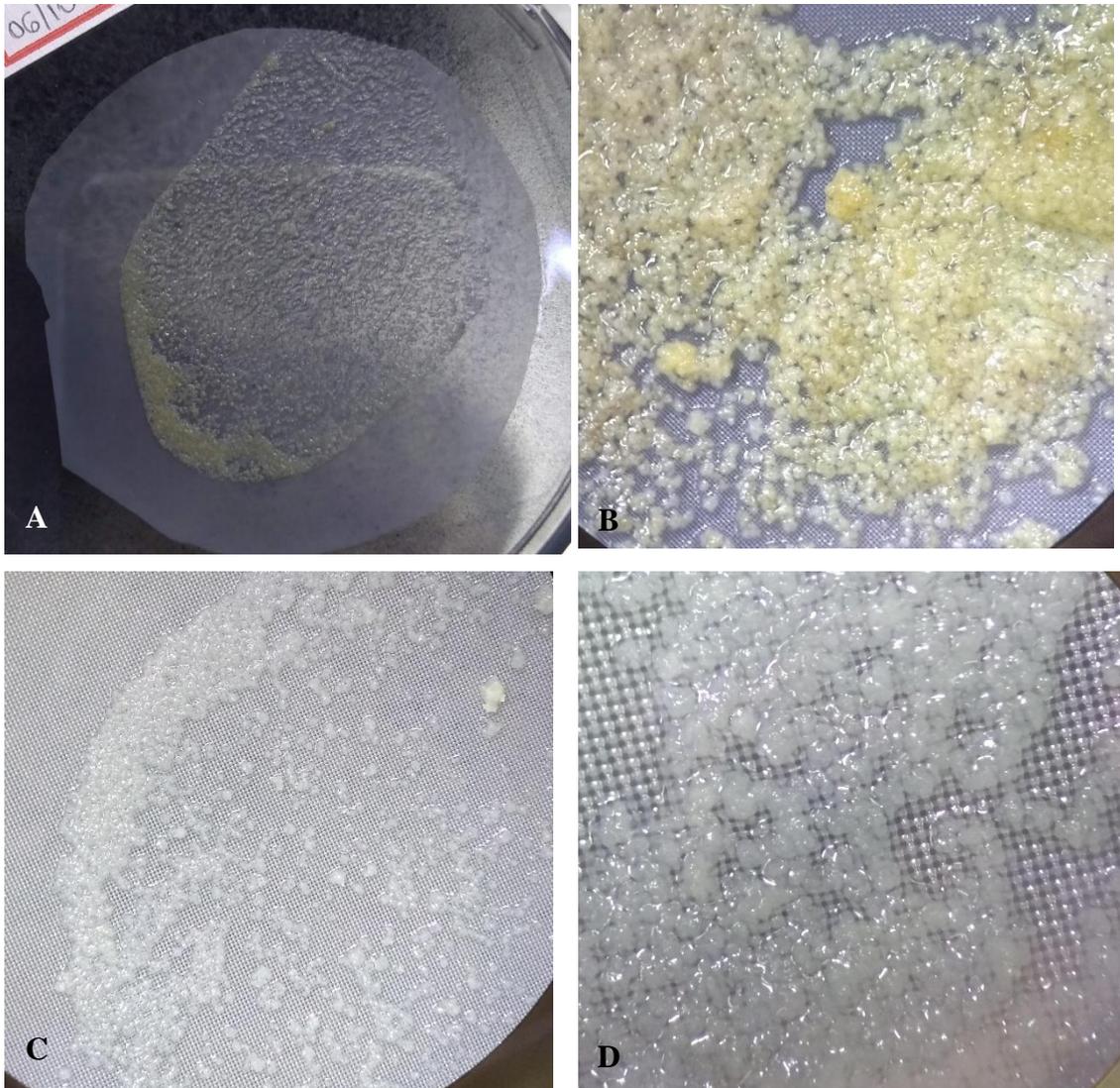


Figura 5 - Suspensões celulares após 60 dias em meios de maturação. (A) e (B): tratamento com maltose; (C) e (D): tratamento com sacarose.

Fonte: Da autora (2021).

### 3.4.2 Calos embriogênicos

As imagens obtidas mostram os calos que ficaram, primeiramente, 15 dias nos tratamentos do meio de sinalização e 60 dias no meio de maturação (Figura 6.1 – 6.8).

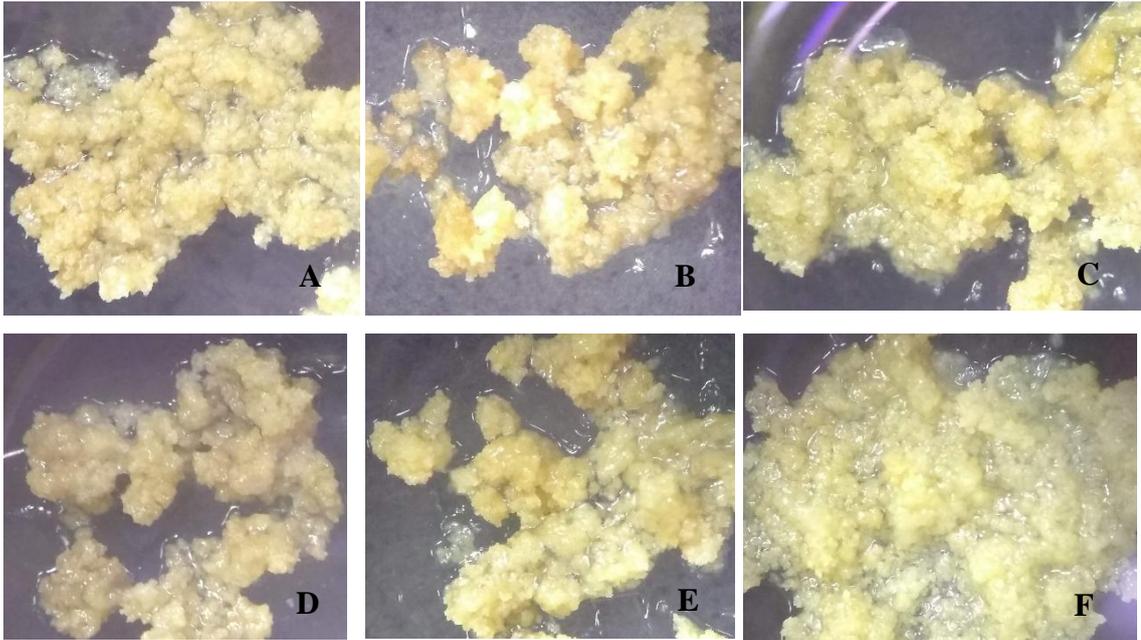


Figura 6.1 - Calos de *E. urograndis*, 15 dias no meio Controle sem ABA e sem PEG. Meio de maturação A) T1: 30 g/L sacarose; B) T2: 60 g/L sacarose, C) T3: 90 g/L sacarose, D) T4: 30 g/L maltose, E) T5; 60 g/L maltose, F) T6: 90 g/L maltose.

Fonte: Da autora (2021).

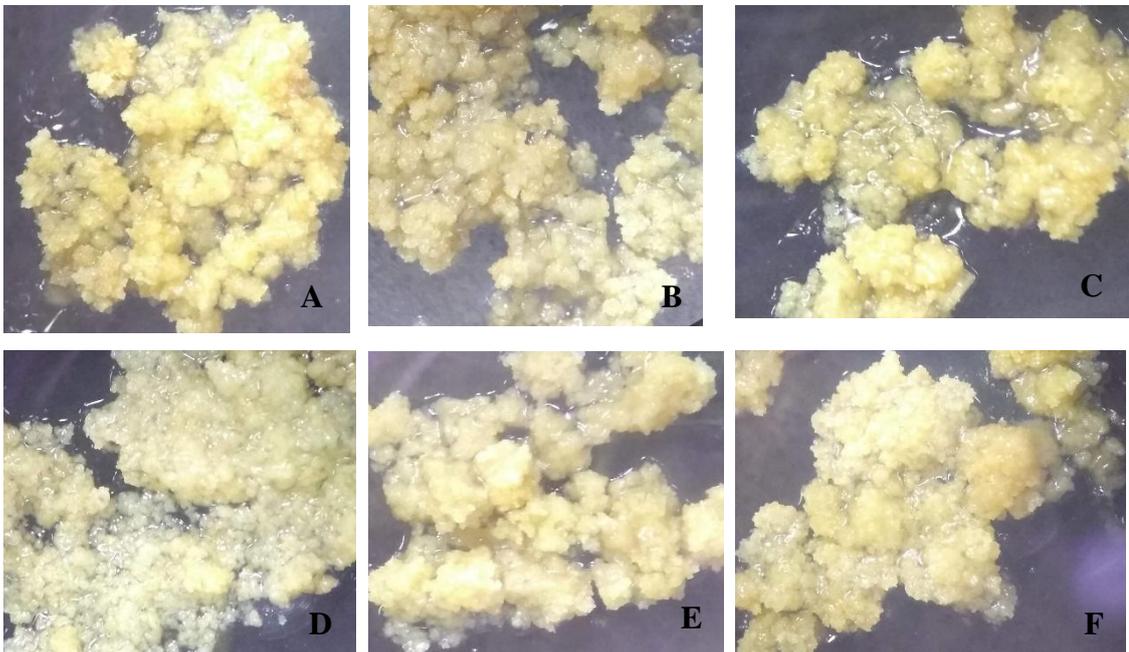


Figura 6.2 - Calos de *E. urograndis*, 15 dias no meio 13,15 mg/L de ABA. Meio de maturação (A) T1: 30 g/L sacarose; (B) T2: 60 g/L sacarose; (C) T3: 90 g/L sacarose; (D) T4: 30 g/L maltose; (E) T5; 60 g/L maltose; (F) T6: 90 g/L maltose.

Fonte: Da autora (2021).

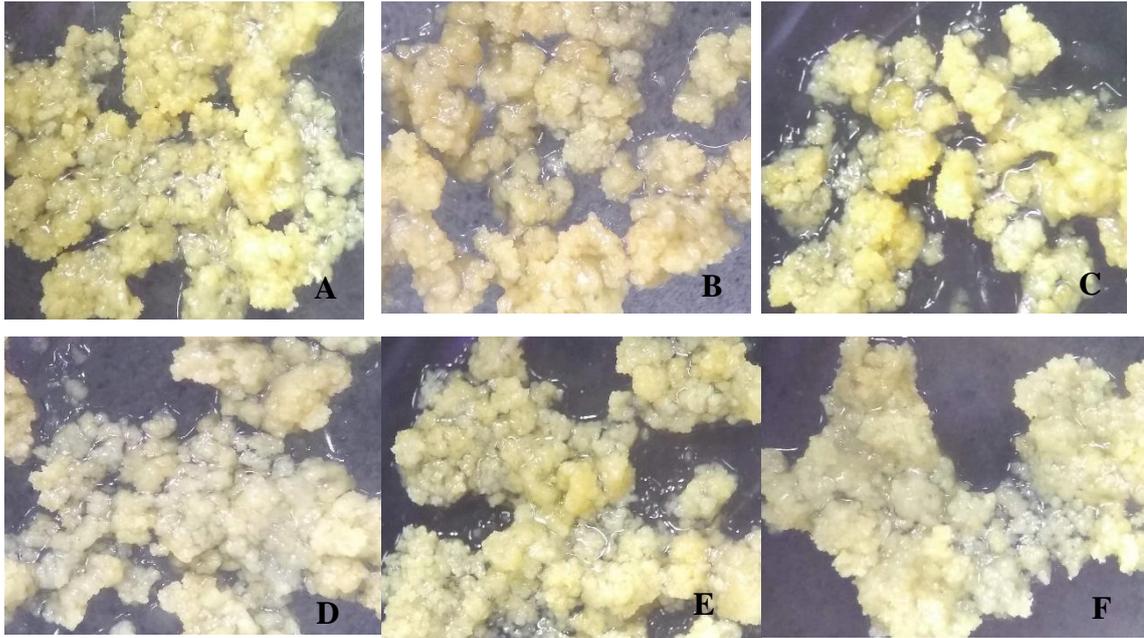


Figura 6.3 - Calos de *E. urograndis*, 15 dias no meio 26,31 mg/L de ABA. Meio de maturação (A) T1: 30 g/L sacarose; (B) T2: 60 g/L sacarose; (C) T3: 90 g/L sacarose; (D) T4: 30 g/L maltose; (E) T5; 60 g/L maltose; (F) T6: 90 g/L maltose.

Fonte: Da autora (2021).

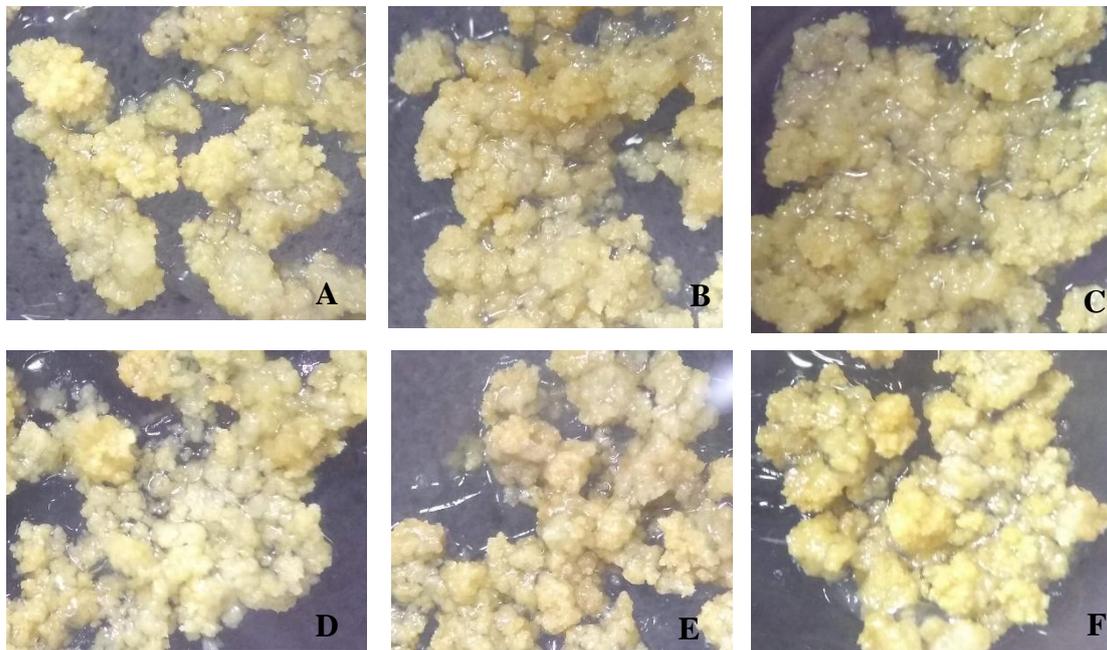


Figura 6.4 - Calos de *E. urograndis*, 15 dias no meio 39,46 mg/L de ABA. Meio de maturação (A) T1: 30 g/L sacarose; (B) T2: 60 g/L sacarose; (C) T3: 90 g/L sacarose; (D) T4: 30 g/L maltose; (E) T5; 60 g/L maltose; (F) T6: 90 g/L maltose.

Fonte: Da autora (2021).

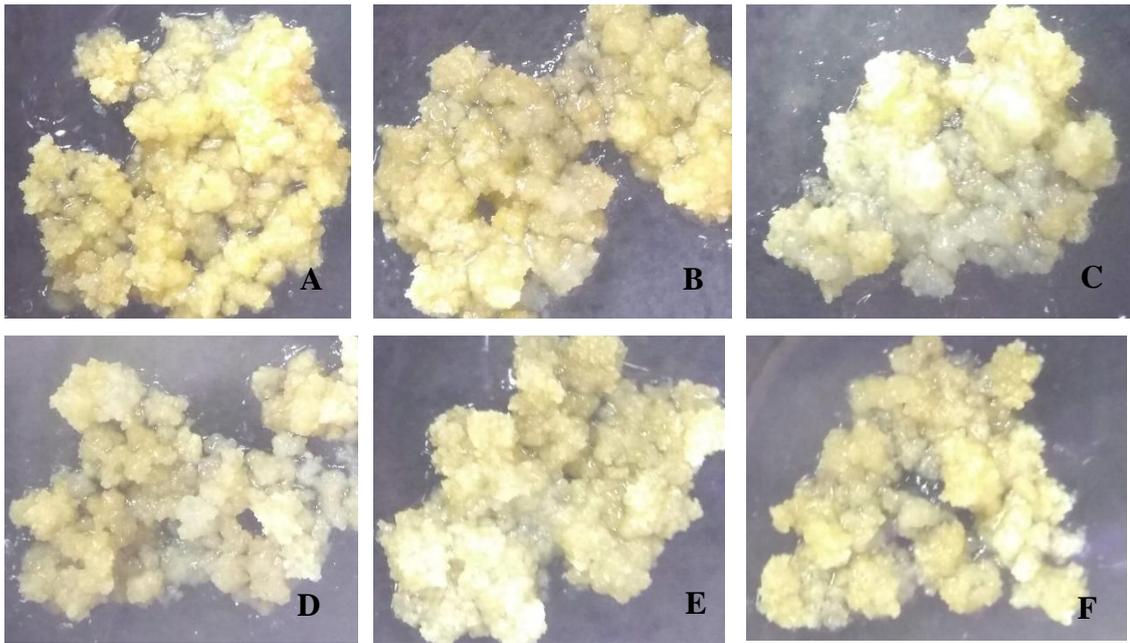


Figura 6.5 - Calos de *E. urograndis*, 15 dias no meio 00,00 mg/L de ABA + 25 g/L de PEG. Meio de maturação (A) T1: 30 g/L sacarose; (B) T2: 60 g/L sacarose; (C) T3: 90 g/L sacarose; (D) T4: 30 g/L maltose; (E) T5: 60 g/L maltose; (F) T6: 90 g/L maltose. Fonte: Da autora (2021).

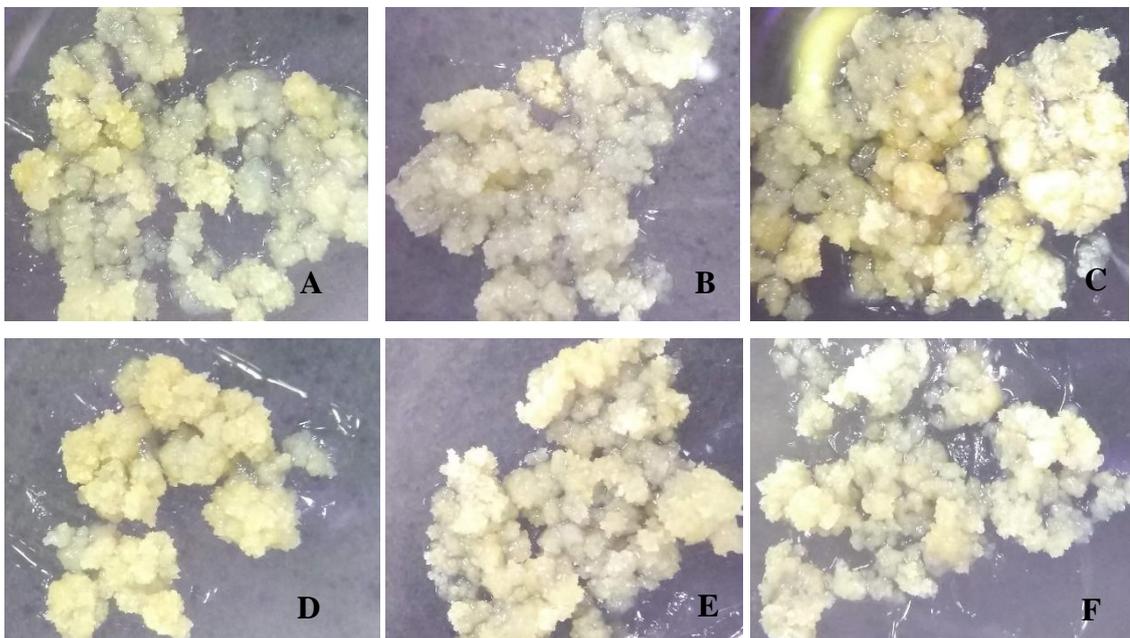


Figura 6.6 - Calos de *E. urograndis*, 15 dias no meio 13,15 mg/L de ABA + 25 g/L de PEG. Meio de maturação (A) T1: 30 g/L sacarose; (B) T2: 60 g/L sacarose; (C) T3: 90 g/L sacarose; (D) T4: 30 g/L maltose; (E) T5: 60 g/L maltose; (F) T6: 90 g/L maltose. Fonte: Da autora (2021).

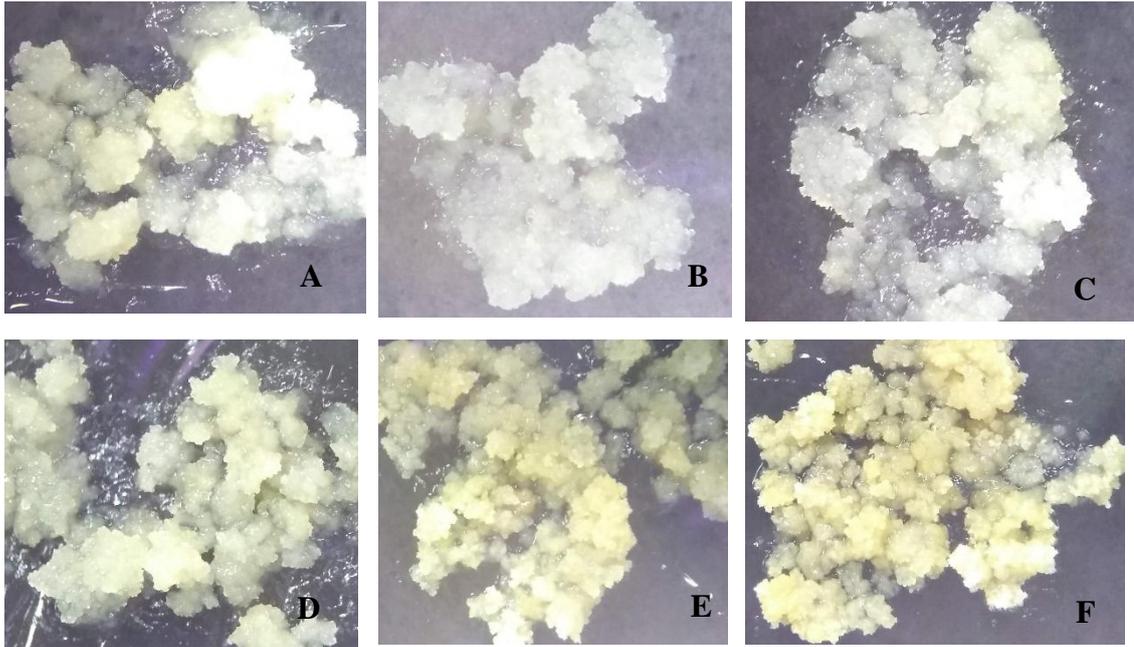


Figura 6.7 - Calos de *E. urograndis*, 15 dias no meio 26,31 mg/L de ABA + 25 g/L de PEG. Meio de maturação (A) T1: 30 g/L sacarose; (B) T2: 60 g/L sacarose; (C) T3: 90 g/L sacarose; (D) T4: 30 g/L maltose; (E) T5: 60 g/L maltose; (F) T6: 90 g/L maltose.

Fonte: Da autora (2021).

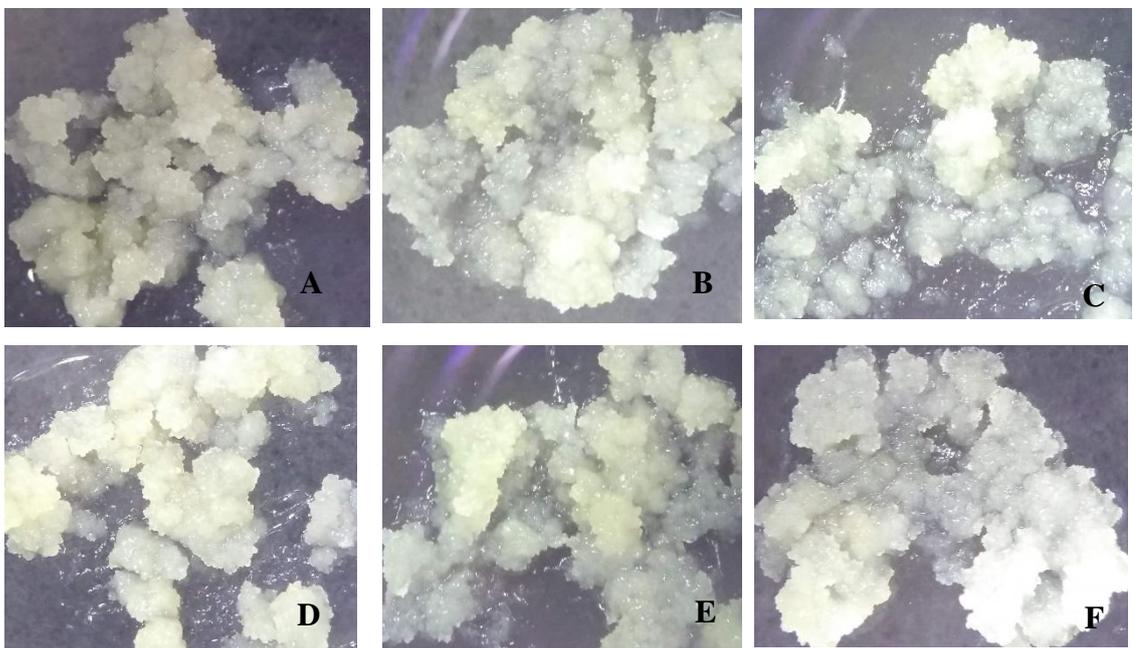


Figura 6.8 - Calos de *E. urograndis*, 15 dias no meio 39,46 mg/L de ABA+ 25 g/L de PEG. Meio de maturação (A) T1: 30 g/L sacarose; (B) T2: 60 g/L sacarose; (C) T3: 90 g/L sacarose; (D) T4: 30 g/L maltose; (E) T5: 60 g/L maltose; (F) T6: 90 g/L maltose.

Fonte: Da autora (2021).

Os calos também foram avaliados aos 90 e 120 dias e não foram observadas nenhuma mudança em relação a avaliação realizadas aos 60 dias.

O fitohormônio ABA está relacionado a resposta ao estresse e desempenha papel significativo no crescimento e desenvolvimento das plantas. No entanto, a influência no crescimento e na diferenciação está relacionada à sua concentração dentro das plantas, que é equilibrada entre a biossíntese e o catabolismo nas plantas (NAMBARA & MARION-POLL, 2005). O ABA tem um papel importante na formação de estruturas embrionárias pré-globulares, no aumento do número de embriões somáticos (FERNANDO, WEERAKOON, GUNATHILAKE, 2004) e na tolerância do embrião à dessecação (ANGOSHTARI et al. 2009), no entanto, em tamareira limitou o crescimento do calo e de embriões (AL-KHAYRI, AL-BAHRANY, 2004; 2012).

A combinação do ABA com um ou vários agentes osmóticos, tem se mostrado eficiente para o processo de maturação em várias espécies florestais, incluindo as coníferas (STEINER et al., 2007; STEINER et al., 2008). Agentes osmóticos são utilizados para diminuir o potencial osmótico do meio de cultura, dentre eles, o PEG é o mais utilizado devido ao seu caráter não plasmolisante. A maltose, assim como outros carboidratos, atua como fonte de carbono e agente osmótico (SHOJI et al., 2006). A sua quebra disponibiliza glicose que é prontamente assimilável pelas células vegetais. Em *Pinus*, a utilização da maltose é preferida em relação à sacarose, por promover aumento no número de embriões somáticos (SALAJOVA et al., 1999). Adicionalmente, esta substância mantém o potencial osmótico do meio negativo e constante por um longo período, devido a sua quebra mais lenta em relação à sacarose.

A recalcitrância ou competência à embriogênese somática depende também do fator genético, como já demonstrado para o eucalipto por Pinto et al. (2008).

Apesar de a auxina ser necessária, essa é insuficiente para criar a iniciação da embriogênese em células vegetais somáticas por conta própria (FEHÉR, 2005). Um modelo plausível da indução de embriogênese somática, portanto, pode basear-se em pelo menos dois fatores: auxina, que é responsável por um fator apropriado célula-ambiente, e outro desconhecido, incluindo o estresse e o fator genético, que desencadeiam o programa embriogênico (FEHÉR, 2005). Neste trabalho, foi proposto o uso do ABA e PEG na sinalização e o uso de diferentes fontes de carbono, a maltose e a sacarose, na maturação, com o intuito de potencializar a regeneração de embriões somáticos de *E. urograndis*.

Entretanto, diante dos resultados obtidos nesse trabalho, o ABA e o PEG, bem como, as fontes de carbono, devem ser testados em outras concentrações para verificar a sua eficiência na formação de estruturas embrionárias e de embriões somáticos de *E urograndis*.

#### 4 CONCLUSÃO

O uso do meio N6 com 400 µM da auxina Picloram promoveu a indução de calos embriogênicos para *E. urograndis*.

O meio líquido N6M5 pode ser utilizado na multiplicação em larga escala das células embriogênicas.

Novos testes de regeneração em meio semissólido devem ser realizados a fim de obtenção e regeneração de embriões somáticos.

#### REFERÊNCIAS

- AHMAD, P. *et al.* Polyamines: Role in Plants Under Abiotic Stress. *In*: AHMAD, P. *et al.* **Crop Production for Agricultural Improvement**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 491-512. ISBN 9789400741157. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4116-4\\_19](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4116-4_19).
- AL-KHAYRI, J. Genotype-dependent in vitro response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. **Scientia Horticulturae**, v. 99, n. 2, p. 153-162, 6 fev. 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0304-4238\(03\)00091-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4238(03)00091-8).
- AL-KHAY, J. M.; AL-BAHR, A. M. Effect of Abscisic Acid and Polyethylene Glycol on the Synchronization of Somatic Embryo Development in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Biotechnology (Faisalabad)**, v. 11, n. 6, p. 318-325, 15 out. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/biotech.2012.318.325>.
- ANGOSHTARI, R. *et al.* Effects of Abscisic Acid on Somatic Embryogenesis and Induction of Desiccation Tolerance in *Brassica napus*. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 4, p. 276-284, 1 maio 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/ajps.2009.276.284>.
- CHU, C. C. *et al.* Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. **Scientia Sinica**, v. 16, p. 659-668, 1975.

CORREA, T. R. *et al.* Accelerated in vitro propagation of elite oil palm genotypes (*Elaeis guineensis* Jacq.) by substituting cytokinin with putrescine. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 50, p. 2767-2775, 14 dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/ajb2016.15670>.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis — Stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>.

FEHÉR, A. Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? *In*: FEHÉR, Attila. **Plant Cell Monographs**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. p. 85-101. ISBN 3540287175. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/7089\\_019](https://doi.org/10.1007/7089_019).

FERNANDO, S. C.; WEERAKOON, L. K.; GUNATHILAKE, T. R. Micropropagation of coconut through plumule culture. **Cocos**, v. 16, p. 01, 31 ago. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4038/cocos.v16i0.1003>.

FERREIRA, DF. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium (Lavras)**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FRANSZ, P. F.; SCHEL, J. H. N. Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 1, p. 26-33, 1 jan. 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/b91-005>. Acesso em: 20 ago. 2021.

GANAPATHI, T. R. *et al.* Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 2, p. 157-162, 16 fev. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002990000287>.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. (ed.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. *E-book*. ISBN 9781402050046. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>.

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

GUREL, S.; GUREL, E.; KAYA, Z. Establishment of cell suspension cultures and plant regeneration in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Turkish Journal of Botany**, Tübitag, v. 26, p. 197-205, 2002.

JALIL, M.; KHALID, N.; OTHMAN, R. Y. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, p. 209-214. 2003.

JOHANSEN, D. A. Plant Microtechnique. **Nature**, v. 147, n. 3721, p. 222, fev. 1941. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/147222b0>.

JUNIOR, D. L.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 429-438, 31 dez.

2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.528>. Acesso em: 20 ago. 2021., v. 33, n. 76, p. 429-428, 2013.

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

LOYOLA-VARGAS, V. M.; VÁZQUEZ-FLOTA, F. **Plant Cell Culture Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2005. *E-book*. ISBN 1592599591. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/1592599591>. Acesso em: 20 ago. 2021.

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

MISHRA, P.; BHOOMIKA, K.; DUBEY, R. S. Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive *Indica* rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Protoplasma**, v. 250, n. 1, p. 3-19, 24 dez. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0365-3>.

MOHANDAS, S. *et al.* Transformation of the banana cultivar 'Nanjangud rasbale' (syn. 'rasthali', AAB, silk subgroup) with the AMP gene and screening for *Fusarium* resistance with a bioassay. **Acta Horticulturae**, n. 897, p. 293-296, maio 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.17660/actahortic.2011.897.38>.

MOHANDAS, S. *et al.* Transgenic banana cv. Rasthali (AAB, Silk gp) harboringn Ace-AMP1 gene imparts enhanced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* race 1. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 392-399, 2013.

MORAIS-LINO, L.S. *et al.* Cell suspension culture and plant regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1325-1330, out. 2008.

MOURA, L. C. *et al.* Auxin pulse in the induction of somatic embryos of *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 43, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-90882019000300002>.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, jul. 1962. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 165-185, jun. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>.

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

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, jun. 1964. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf01248568>.

PINTO, G. *et al.* Genetic control of somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globules* Labill. **Plant Cell Reports**, n; 27, p.1093-1101, 2008.

RAJESH, M. K. *et al.* Polyamine-induced somatic embryogenesis and plantlet regeneration in vitro from plumular explants of dwarf cultivars of coconut (*Cocos nucifera*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 84, n. 4, p. 527–30, 2014.

REIS, M.V. **Caracterização de massas pró-embriogênicas de ipê-branco**, 2010. 50 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

REIS, R. S. *et al.* Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. **Journal of Proteomics**, v. 130, p. 170–179, 2016.

RELATÓRIO ANUAL. **Indústria Brasileira de Árvores**. Instituto Brasileiro de Economia – IBRE, Fundação Getúlio Vargas, Brasília, DF. 2020.

ROCHA, D. I. *et al.* Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 747-758, 17 set. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0318-x>.

SAKHANOKHO, H. F. *et al.* Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 91–95, 2005.

SALAJOVA, T.; SALAJ, J.; KORMUTAK, A. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. **Plant Science**, v. 145, n. 1, p. 33-40, jul. 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(99\)00067-9](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(99)00067-9).

SHOJI, M. *et al.* Influence of osmotic pressure on somatic embryo maturation in *Pinus densiflora*. **Journal of Forest Research**, v. 11, n. 6, p. 449-453, dez. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10310-006-0227-6>.

SILVEIRA, V. *et al.* Effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, v. 171, p. 91–98, 2006.

SILVEIRA, V. *et al.* Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 114, p. 351–364., 2013.

SOUZA, R. A. V. *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration from an elite tropical maize inbred line. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 3 , 2016.

STEINER, N. *et al.* *Araucaria angustifolia* Biotechnology. **Functional Plant Science and Biotechnology**; v. 2, p. 20-28; 2008.

STEINER, N. *et al.* Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 55-62, 8 mar. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9216-5>.

STEINER, N. *et al.* Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

VALENTE, C. **Caracterização de funções mitocondriais em *Araucaria angustifolia***. 2007. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímicas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

VON ARNOLD, S. *et al.* Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p.233-249, 2002.

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

## APÊNDICE

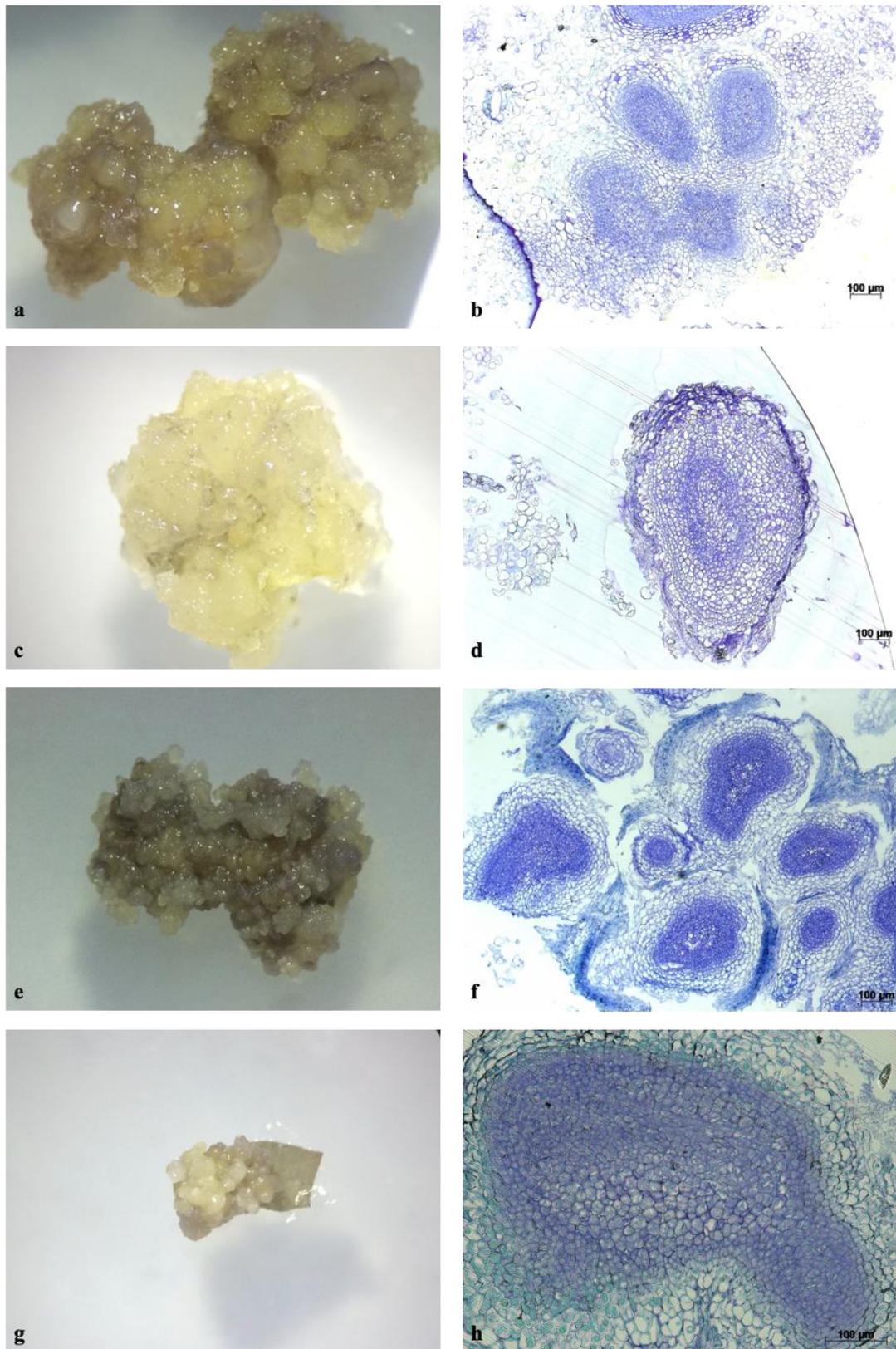


Figura A - Calos oriundos de folha e seus respectivos cortes histológicos de *E. grandis* após 60 dias no meio de indução N6, em diferentes tratamentos. a-b: 100 µM; c-d: 200µM; e-f: 400 µM; g-h: 800 µM.

Fonte: Da autora (2021).

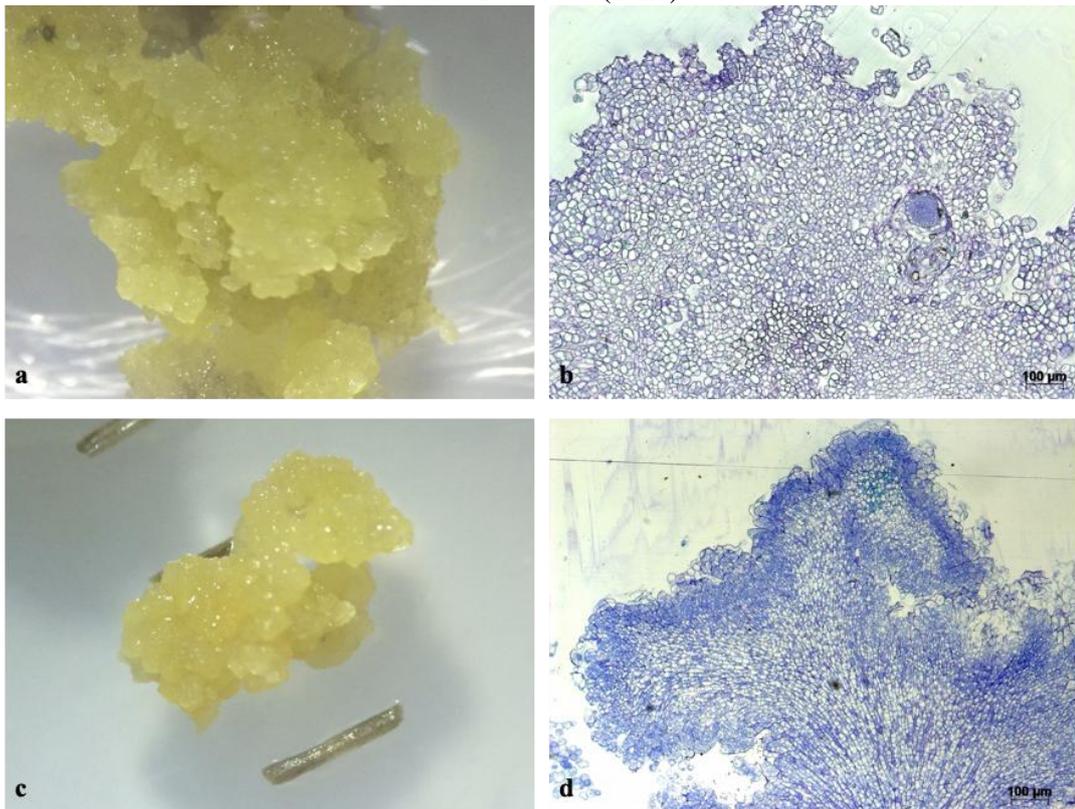


Figura B - Calos oriundos de hipocótilo e seus respectivos cortes histológicos de *E. grandis* após 60 dias no meio de indução N6, em diferentes tratamentos. a-b: 100  $\mu\text{M}$ ; c-d: 800  $\mu\text{M}$ .

Fonte: Da autora (2021).

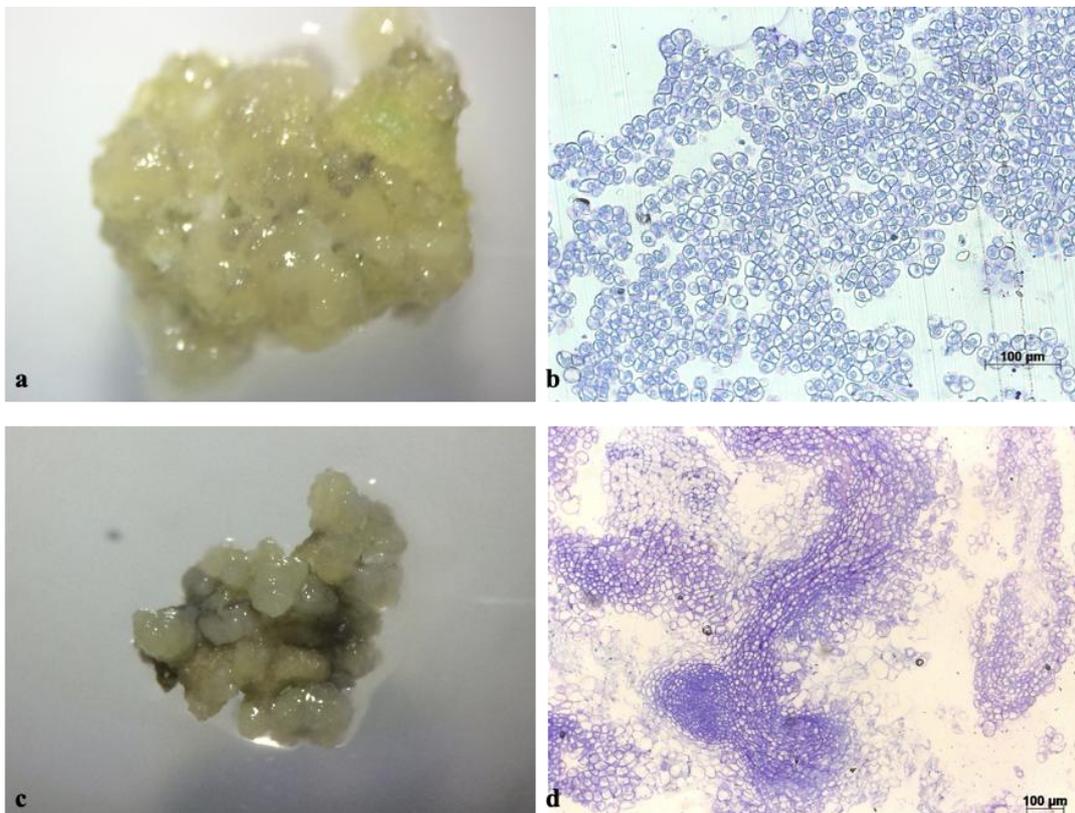


Figura C - Calos oriundos de folha e seus respectivos cortes histológicos de *E. grandis* após 60 dias no meio de indução MS, em diferentes tratamentos. a-b: 200  $\mu$ M; c-d: 800  $\mu$ M.

Fonte: Da autora (2021).

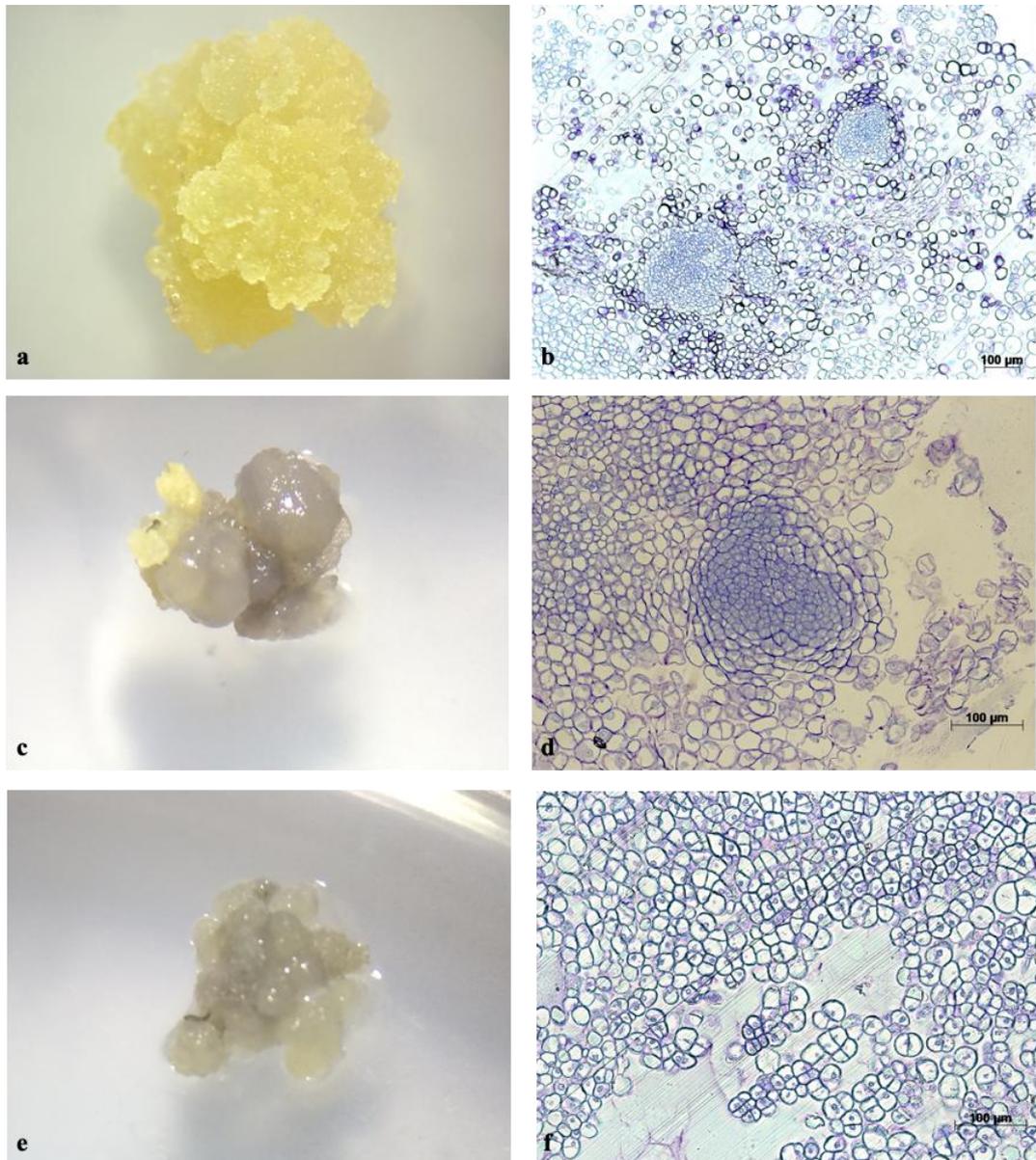


Figura D - Calos oriundos de hipocótilo e seus respectivos cortes histológicos de *E. grandis* após 60 dias no meio de indução MS, em diferentes tratamentos. a-b: 200  $\mu$ M; c-d: 400 $\mu$ M; e-f: 800  $\mu$ M.

Fonte: Da autora (2021).

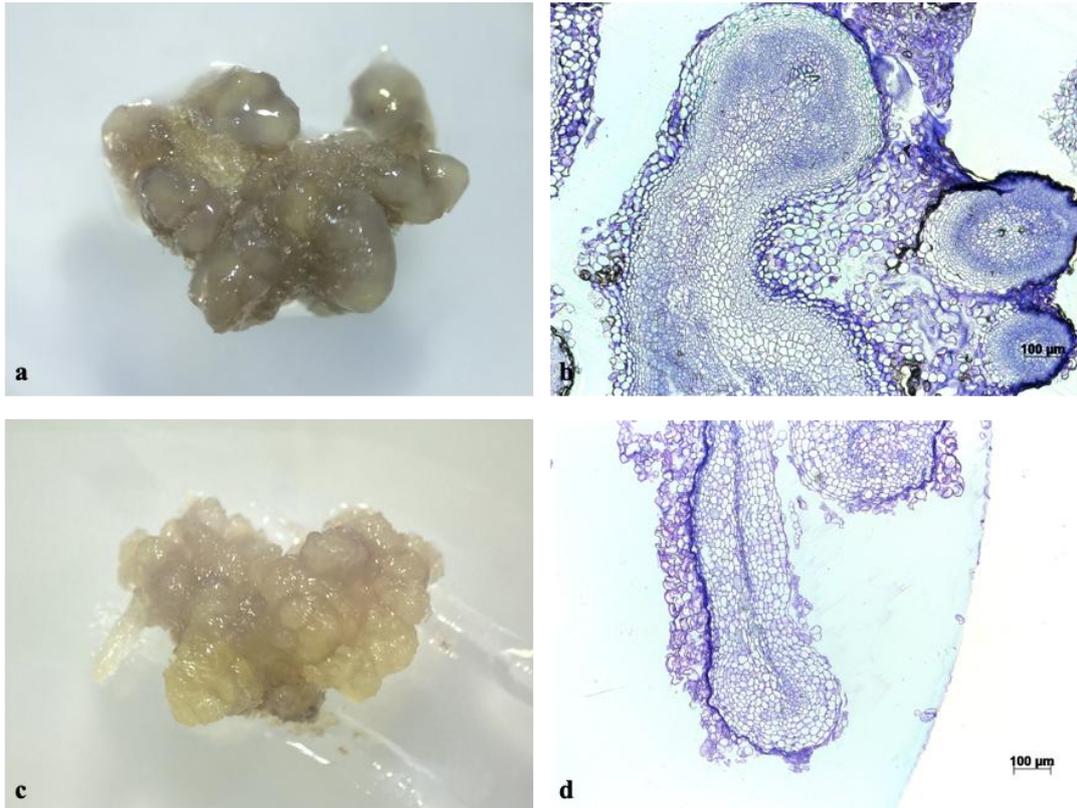


Figura E - Calos oriundos de folha e seus respectivos cortes histológicos de *E. grandis* após 60 dias no meio de indução JADS, em diferentes tratamentos. a-b: 200  $\mu\text{M}$ ; c-d: 800  $\mu\text{M}$ .

Fonte: Da autora (2021).

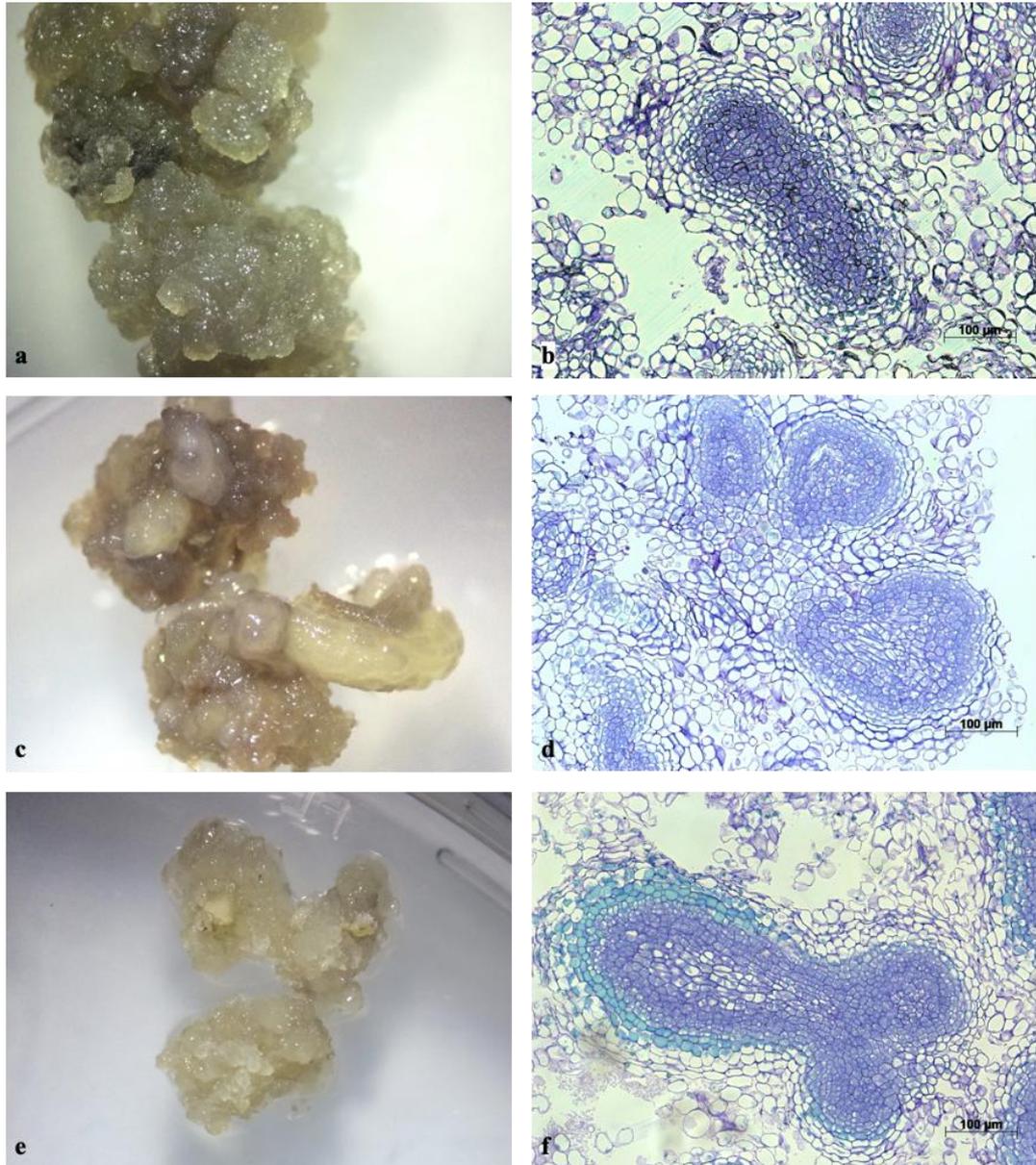


Figura F - Calos oriundos de hipocótilo e seus respectivos cortes histológicos de *E. grandis* após 60 dias no meio de indução JADS, em diferentes tratamentos. a-b: 100 µM; c-d: 200 µM; e-f: 400 µM.

Fonte: Da autora (2021).