**ATUAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DE BORO NA
MORFOGÊNESE DE *Eucalyptus urophylla* CULTIVADOS *in vitro***

RAQUEL TREVIZAM
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. Marcilio de Almeida

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 2001

ERRATA

ONDE SE LÊ:	LEIA-SE:	PÁGINAS:
mM de boro	µM de boro	35, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 75
15 µL de extrato protéico	15 µg de extrato proteico	40
SDS	Dodecil sulfato de sódio	37, 40
Tris	Hydroximetilaminometano	37, 40
DMSO	Dimetilsulfóxido	37
PVP	Polivinil polipirrolidona	37
TEMED	Tetrametiletilenoediamina	40
APS	Perfulfato de amônio	39, 40

SUMMARY

Boron is an essential element for superior plants growth and development. Nevertheless, its cellular functions are issue for frequent studies. In attempt to identify and quantify the likely implications of this micronutrient in the morphological development of *Eucalyptus urophylla*, calus were growth *in vitro* with variation in boron concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 µM), being after examined as regards to their external morphology, fresh and dry weight, biochemical composition (non-structural carbohydrate, total soluble proteins, proline, eletroforesys in polyacrilamide gel, pectins and uronic acid) and anatomy. Non structural carbohydrate displayed their largest contents in toxic doses of boron. Total soluble proteins did not show important changes when increasing boron concentrations were tested. Toxic levels (100 and 200 µM) doubled proline contents in those wich standard (50 µM) or insufficient (0 and 25 µM) doses were used. The analysis of the gel shown important differences in the molecular weights of proteical bands regarding to the applied doses of 50 and 100 µM of boron. Pectins did not have their contents affected, showing that B probably does not take part in the formation of these structural unities of cellular walls. Boron of deficiency (0 µM), caused defective growth in calus, anatomical problems, collapse and cellular disorders. The treatment with 50 µM of B resulted in larger growth than those observed in calli treatments with more higher or lower doses, also showing intense cellular division and the presence of probable embryogenetic structures. The toxicity caused by boron resulted in smaller growth for the calus and exaggerated formation of roots.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Trevizam, Raquel

Atuação de concentrações de boro na morfogênese de *Eucalyptus urophylla*
cultivados *in vitro* / Raquel Trevizam. - - Piracicaba, 2001.
85 p. : il.

Dissertação (mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Anatomia vegetal 2. Bioquímica vegetal 3. Boro 4. Cultivo "in vitro" 5.
Eucalipto 6. Morfogênese somática I. Título

CDD 634.9734

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais Jacir, Valentina de
e ao meu irmão Matheus, por todo
o amor

OFEREÇO

A todos que acreditam e lutam por um futuro feliz e melhor.

DEDICO

**“Compartilhar o conhecimento é uma forma de alcançar a
imortalidade”**

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida pela oportunidade e orientação durante todos estes anos;

Ao Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves pela coorientação e ajuda durante a realização dos trabalhos;

A Prof. Dr^a. Márcia Regina Braga, pelo suporte e auxílio nos ensaios bioquímicos relacionados a parede celular;

Ao amigo Gustavo Maia Souza, pela dedicada colaboração nos ensaios bioquímicos;

A Cristina de Almeida, pelo carinho e ajuda na correção da dissertação;

Aos amigos do LAFISA (Laboratório de Fisiologia das Árvores) pelas horas agradáveis e produtivas. Em especial, ao Vanderlei A. Stefanutto, pelas boas risadas e companheirismo;

Aos professores e funcionários do departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP;

Aos técnicos Beto (LAFISA), Cássia (Lab. de Morfogênese e Biologia Reprodutiva) e Marli (Lab. de Anatomia Vegetal), por toda ajuda dispensada e pelo amparo prestimoso em várias etapas desta dissertação;

Aos amigos que não estiveram fisicamente próximos, mas presentes em cada lembrança;

Ao querido amigo Roger Marzochi, por ter acreditado sempre (NÓS CONSEGUIMOS!);

As grandes amigas, Ilana U. Bron e Marcela T. Capoanni, por todos os momentos compartilhados ao longo deste caminho;

Ao meu Fabiano, por sua presença em minha vida e ainda pela valiosa ajuda, amor, paciência infinita e presença durante a realização desta dissertação

Ao CNPq pela concessão da bolsa;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADA.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Embriogênese Somática	19
3.2 Boro	25
4 MateRial e Métodos	33
4.1 Material vegetal	33
4.1.1 Desinfestação de sementes	33
4.1.2 Inoculação das sementes	33
4.1.3 Explantes	34
4.1.4 Meios de cultura para indução de calos	34
4.1.5 Meios de cultura com diferentes concentrações de boro	34
4.2 Avaliação de calos obtidos	35
4.2.1 Avaliação morfológica e determinação de massa fresca em calos de <i>E. urophylla</i>	35
4.2.2 Determinação de massa fresca e seca de calos com diferentes concentrações de boro	35
4.3 Determinação de carboidratos não estruturais totais (Método de Antrona - Yemm e Willis, 1954)	36
4.3.1 Preparo dos reagentes e extração	36
4.3.2 Análise das amostras de carboidratos não estruturais totais	36
4.4 Quantificação de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)	37
4.4.1 Preparo de reagentes e extração de proteínas totais	37
4.4.2 Análise das amostras de proteínas totais	38
4.5 Avaliação de prolina (Bates, 1973)	38

4.5.1	Extração e preparo dos reagentes.....	38
4.5.2	Análise das amostras de prolina.....	39
4.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para proteínas totais	39
4.6.1	Extração das proteínas	39
4.6.2	Preparo dos géis de poliacrilamida.....	39
4.6.3	Revelação e coloração dos géis.....	40
4.7	Extração de componentes da parede celular.....	40
4.7.1	Extração da parede celular de calos de <i>E. urophylla</i>	40
4.7.2	Extração de resíduos sólidos insolúveis em álcool (AIR).....	41
4.7.3	Fracionamento da parede celular	41
4.7.4	Colunas de Sephadex G-25.....	42
4.8	Análise de pectinas (açúcares totais em paredes de calos de <i>E. urophylla</i> - Método fenol-sulfúrico-Dubois <i>et al.</i> , 1956)	42
4.8.1	Extração e preparo dos reagentes.....	42
4.8.2	Análise das amostras de pectinas.....	42
4.9	Quantificação de ácido urônico (Fry <i>et al.</i> , 1988).....	43
4.9.1	Extração e preparo dos reagentes.....	43
4.10	Estudos anatômicos e morfológicos de calos de <i>E. urophylla</i> cultivados sob concentrações de boro	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	Material vegetal	45
5.2	Avaliação de calos obtidos	46
5.2.1	Avaliação morfológica e determinação de massa fresca em calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 (Simola, 1985) com Picloran e caseína hidrolisada	46

5.2.2	Determinação de massa fresca e seca de calos com concentrações de boro	49
5.3	Determinação de carboidratos não estruturais totais (Método de Antrona - Yemm e Willis, 1954)	53
5.3.1	Extração e preparo do reagente	53
5.3.2	Análise das amostras de carboidratos não estruturais totais	54
5.4	Quantificação de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)	56
5.4.1	Preparo de reagentes e extração de proteínas totais	56
5.4.2	Análise das amostras de proteínas totais	58
5.5	Avaliação de prolina (Bates, 1973)	59
5.5.1	Extração e preparo dos reagentes	59
5.5.2	Análise das amostras de prolina	61
5.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para análise de proteínas totais	62
5.7	Extração de componentes da parede celular: Análise de pectinas (açúcares totais em paredes de calos de <i>E. urophylla</i> - Método fenol-sulfúrico-Dubois <i>et al.</i> , 1956)	63
5.7.1	Extração e preparo dos reagentes	63
5.7.2	Análise das amostras de pectinas	65
5.8	Quantificação de ácido urônico (Fry <i>et al.</i> , 1988)	66
5.8.1	Extração e preparo dos reagentes	66
5.8.2	Análise das amostras	67
5.9	Estudos organográficos e anatômicos de calos de <i>E. urophylla</i> cultivados sob diferentes concentrações de boro.	69
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
7	CONCLUSÃO	76
8	Referências Bibliográficas	77

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Variação na massa fresca de calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com adição de Picloran e caseína hidrolisada	47
Figura 2. Variação na massa fresca de calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro	51
Figura 3. Variação na massa seca de calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro.....	52
Figura 4. Curva analítica de calibração para glicose.....	54
Figura 5. Conteúdo de açúcares totais em calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro.....	56
Figura 6. Curva analítica de calibração para albumina.....	57
Figura 7. Conteúdo de proteínas totais em calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro	59
Figura 8. Curva analítica de calibração para prolina.....	60
Figura 9. Conteúdo de prolina em amostras de calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro	62
Figura 10. Aspecto das bandas protéicas observadas em calos de <i>E. urophylla</i>	63
Figura 11. Curva analítica de calibração para glicose	64
Figura 12. Porcentagem de pectinas na parede celular de calos de <i>E. urophylla</i> cultivados sob diferentes concentrações de boro.....	66
Figura 13. Curva padrão para ácido urônico.....	67
Figura 14. Concentração de ácido urônico em calos de <i>E. Urophylla</i>	68
Figura 15. Morfologia externa de calos de <i>E.urophylla</i> cultivados em N7 com diferentes concentrações de boro.	69
Figura 16. (A-E). Aspectos morfológicos externos de calos de <i>E. urophylla</i> aos 21 dias de cultivo . (A) Calos com 0 mM de boro apresentando ausência de diferenciação e aspecto gel. Bar=870 µm. (B), calos com 25 mM de B apresentando estruturas globulares na superfície. Bar=810 µm; (C), calos com 50 mM de B apresentando região com antocianinas (seta) e grande friabilidade. Bar=810 µm; (D), calos com 100	

mM de B, apresentando aspecto menos friável. Bar=590 μm ; (E), calos cultivados com 200 mM de B apresentando grande quantidade de raízes. Bar=590 μm73

Figura 17 Aspectos anatômicos de calos de *E. urophylla* aos 21 dias de cultivo. (A), secção longitudinal do calo mostrando células colapsadas (seta). Bar= 199 μm . (B) Centros meristemáticos com intensa divisão celular e nucléolos proeminentes (seta). Bar= 37 μm . (C) Centros meristemáticos crescidos a partir da epiderme de calos (seta). Bar= 37 μm . (D) Formação de estruturas radiculares em calos. Bar= 199 μm 74

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Tratamentos empregados e doses de boro em mM.....	35
Tabela 2 Variação na massa fresca de calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com adição de Picloran e caseína hidrolisada	47
Tabela 3. Análises morfológicas semanais em calos de <i>E. urophylla</i> induzidos em meio N7 com adição de Picloran e caseína hidrolisada.	48
Tabela 4. Variação na massa fresca de calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro	50
Tabela 5. Variação na massa seca de calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro	52
Tabela 6. Valores de absorbância utilizados para preparo de curva analítica de calibração para glicose.....	53
Tabela 7. Conteúdo de açúcares totais em calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro	55
Tabela 8. Valores de absorbância utilizados para preparo de curva analítica de calibração para albumina	56
Tabela 9. Conteúdo de proteínas totais em calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro	58
Tabela 10. Valores de absorbância utilizados para preparo de curva analítica de calibração para prolina.....	60
Tabela 11. Conteúdo de prolina em amostras de calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro.....	61
Tabela 12. Valores de absorbância utilizados para preparo de curva analítica de calibração para glicose.....	64
Tabela 13. Conteúdo de pectinas em calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro.....	65
Tabela 14. Conteúdo de ácido urônico em calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro	67

Tabela 15. Conteúdo de ácido urônico em calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro	68
Tabela 16. Análises morfológicas em calos de <i>E. urophylla</i> cultivados em diferentes concentrações de boro realizadas durante o 21º dia de cultivo	70

ATUAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DE BORO NA MORFOGÊNESE DE *Eucalyptus urophylla* CULTIVADOS *in vitro*

Autor : RAQUEL TREVIZAM

Orientador : MARCILIO DE ALMEIDA

RESUMO

O boro é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento de plantas superiores, no entanto suas funções celulares são objeto constante de estudo. Como forma de identificar e quantificar as possíveis implicações do micronutriente no desenvolvimento morfogênético de *Eucalyptus urophylla*, calos foram cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de boro (0, 25, 50, 100 e 200 mM) e posteriormente avaliados quanto a morfologia externa, conteúdo de massa fresca e seca, composição bioquímica (carboidratos não estruturais, proteína totais, prolina, eletroforese em gel de poliacrilamida, pectinas e ácido urônico) e anatomia. Carboidratos não estruturais totais apresentaram seus maiores valores em doses tóxicas de B. Proteínas totais não tiveram mudança significativa quando concentrações crescentes de boro foram testadas. Níveis tóxicos (100 e 200mM), apresentaram valores de prolina duas vezes superior aos tratamentos com doses padrão (50 mM de B) e deficientes (0 e 25 mM de B). A análise do gel de poliacrilamida não mostrou diferenças marcantes nos pesos moleculares das bandas protéicas em relação as doses de boro aplicadas. Pectinas e ácido urônico não tiveram o seu conteúdo total afetado, evidenciando que o boro provavelmente não participa da formação destas unidades estruturais das paredes celulares. Doses insuficientes do micronutriente (0 e 25 mM), causaram crescimento deficiente nos calos e anatomicamente, colapso e desestruturação celular. O tratamento com 50 mM de B apresentou crescimento superior ao de calos com doses superiores e inferiores a esta, evidenciando também divisão celular intensa e presença de

prováveis estruturas embriogênicas. A toxidez por B causou um crescimento reduzido dos calos e formação exagerada de estruturas radiculares.

EVALUATION OF BORON CONCENTRATIONS IN THE MORFOGENESIS OF *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro*

Author : RAQUEL TREVIZAM

Adviser: MARCILIO DE ALMEIDA

SUMMARY

Plants needs boron for growth and development and the boron key are constantly object of studies.

To identify and quantify the boron function in the morfogenetic development of *Eucalyptus urophylla*, *calus* were growth *in vitro* with different concentrations of boron (0, 25, 50, 100 e 200 mM). They were evaluated taking into account the external morphology, fresh weight and dry, chemical composition (total carbohydrates, protein, proline, pectins and uronic acid) and anatomy. The 200 mM boron concentrations showed that total carbohydrates are toxic to the *calus*. Protein were not significative for all boron concentration analyzed. The boron concentrations, 100 e 200 mM, showed high values for proline than boron concentrations of 50 mM than boron concentrations of 50 mM.

The pectins and uronic acid did not showed increase in the different boron concentrations analyzed. *Calus* showed a boron deficiency when were used boron concentrations of 0 and 25 mM. The best treatment was with boron concentrations of 50 mM. This treatment showed the highest growth and was noted evidenced cellular division and embryogenic structures. The boron toxic was responsible for a decrease in the *calus* growth and high development of roots

1 INTRODUÇÃO

Desde o início do século XX, o contínuo crescimento populacional e o aumento na utilização de madeira foram responsáveis pelo surgimento do interesse e da necessidade do uso de espécies de eucalipto para a produção de lenha, moirões e dormentes em muitos países. A partir de 1945, a crescente demanda de madeira para fins de produção de celulose, compensados e chapas, assim como o rápido desenvolvimento tecnológico, resultaram em um aumento adicional na área plantada com eucalipto. Desta forma a espécie tornou-se a mais cultivada em todo o mundo (Pryor, 1976).

No Brasil, em geral, as plantações de eucalipto são utilizadas principalmente para a produção de celulose, carvão, chapas duras e para a produção de lenha. Além dos benefícios diretos destas utilizações é importante salientar sua contribuição em programas de recuperação de áreas degradadas, assim como no fornecimento de proteção a áreas críticas, tais como na estabilidade de dunas, controle de erosão, funcionamento hidrológico harmônico das microbacias hidrográficas, na recuperação de áreas de mineração a céu aberto, como quebra ventos (Dias, 1982; Prasad, 1987, Prasad, 1988; Buckley, 1988; Lima, 1990).

Ainda em âmbito nacional, a utilização da madeira de eucalipto como matéria prima para a produção de celulose e papel é um processo irreversível e inquestionável, e o setor ocupa uma posição de destaque no cenário mundial de celulose de eucalipto (Barrichello e Brito, 1976).

Concomitantemente ao que ocorre em países europeus, as plantações de eucaliptos no Brasil firmaram-se como base de um setor industrial em franca expansão (Pryor, 1976).

Frente a crescente utilização deste tipo de material pelas indústrias, tornou-se adequado o estabelecimento de programas visando o estudo da nutrição mineral e aplicação de fertilizantes neste tipo de cultura, viabilizando uma assessoria direta e eficiente junto às companhias florestais.

Em seu ambiente natural esta espécie raramente exhibe sintomas de desordens nutricionais, entretanto em plantações e berçários florestais, estas limitações de macro e micronutrientes são encontradas regularmente (Dell, 1996).

Dados obtidos por Bellote (1979), demonstraram que os macronutrientes mais extraídos por *Eucalyptus* spp. são primeiramente o cálcio seguido por nitrogênio, potássio, enxofre, magnésio e fósforo.

A aplicação de micronutrientes nas plantações de eucalipto tem sido restrita a boro e zinco as quais são geralmente aplicadas conjuntamente com formulações de nitrogênio, fósforo e potássio sendo que as respostas aos micronutrientes são específicas para cada espécie (Barros e Novais, 1996).

No Brasil, o boro é o micronutriente que com mais frequência se mostra deficiente, sendo responsável por perdas na produtividade e na qualidade de produtos manufaturados pelo setor de papel e celulose (Silveira, 2000).

A diagnose visual tem sido a principal ferramenta empregada na detecção dos sintomas de deficiências e toxidez de boro nas culturas de eucalipto. Entretanto, este parâmetro não deve ser considerado de forma isolada, pois sua determinação só acontece quando os sintomas já se estabeleceram dentro da área cultivada.

Através de observações visuais da deficiência e toxidez de boro torna-se possível determinar de forma indireta a importância do íon, nos diversos processos metabólicos da planta.

No entanto, são relativamente escassos os registros da ação direta do boro (Spurr, 1957), o que justifica um estudo detalhado da sua ação sobre os processos morfogênicos, permitindo desta forma, esclarecer seu provável papel na parede celular e todas as consequências nos processos organogênicos e embriogênicos *in vitro*, viabilizando o entendimento de problemas estruturais das células e tecidos,

possibilitando assim avanços nos conhecimentos fisiológicos e bioquímicos em plantas deficientes e com toxidez de boro.

Segundo Bar Akiva (1971), além das avaliações visuais é de grande importância a utilização de testes bioquímicos na avaliação nutricional de vegetais. Estes testes baseiam-se na atividade enzimática, os quais requerem elementos essenciais para a formação normal, ou não, de substratos e produtos finais do metabolismo.

Portanto, para entender os mecanismos de diferenciação celular torna-se necessário avaliar e conhecer os meios pelos quais as diferentes regiões de uma planta ou tecido tornam-se especializados e como regulam o funcionamento integrado da planta (Arruda, 2000).

A utilização de técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* otimiza o entendimento destes processos, permitindo através destas simulações o entendimento de condições *ex vitro* (campo, casa de vegetação e estufas), proporcionando uma opção para a seleção de material genético, uma vez que a técnica permite a obtenção de um número maior de plantas em períodos de tempo e espaços reduzidos, com ausência de contaminantes e maior controle ambiental sem a perda da fidelidade dos genótipos selecionados (Higashi, 1996).

Esta dissertação foi inserida dentro deste contexto, e a escolha do boro como agente indutor de morfogênese baseou-se na formulação das seguintes hipóteses:

1. Evidenciar os prováveis processos primários nos quais o boro se encontra envolvido, viabilizando o entendimento dos mecanismos secundários nos quais o íon possui influência e se expressa.
2. Verificar através das diferentes concentrações de boro aplicadas as modificações ocorridas nos processos morfogênicos e de embriogênese somáticas.

As hipóteses consideradas foram levantadas mediante afirmações extraídas de referências presentes na literatura e constituíram as bases dos objetivos propostos e da metodologia desenvolvida.

2 OBJETIVOS

Com base nas hipóteses estabelecidas a dissertação tem como objetivo geral avaliar a atuação de concentrações de boro (B) nos processos morfogênicos de *Eucalyptus urophylla*, cultivados *in vitro*, visando a indução da embriogênese somática.

Os objetivos específicos propuseram avaliar os processos bioquímicos indicadores de embriogênese somática, como teor de açúcares, proteínas totais e prolina.

A quantificação de pectinas e ácido urônico foram avaliadas como forma de estabelecer as relações do íon na constituição da parede celular e suas relações com os diversos tratamentos empregados no presente estudo.

Análises anatômicas em microscopia óptica, foram realizadas para verificar a existência de embriões somáticos e diferenças entre os tratamentos empregados em nível celular buscando desta forma obter uma interação entre as diversas ferramentas experimentais utilizadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Embriogênese Somática

Todas as células vivas dentro da planta apresentam uma capacidade potencial de regenerar um organismo inteiro, isto é, possuem autonomia para expressar sua totipotência (Fosket, 1994). Portanto todas as células possuem autonomia potencial para regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados (Kerbaudy, 1999).

A cultura de células e tecidos *in vitro*, inclui a organogênese e embriogênese somáticas (Christianson *et al.*, 1988), sendo este último especialmente importante para a propagação de plantas *in vitro* em larga escala, além de uma maneira estratégica para os estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião (Yeung, 1995). A caracterização da embriogênese ocorre por processos onde células haplóides desenvolvem plantas diferenciadas através de estágios embriológicos distintos, sem a fusão de gametas, apresentando embrião somático com aspecto bipolar e sistema vascular fechado (Williams e Mahesmaran, 1986; Schumann *et al.*, 1995; Guerra *et al.*, 1999), sem conexão com tecidos do explante inicial (Guerra *et al.*, 1999).

Considerando-se o potencial de multiplicação e custos envolvidos, a embriogênese somática apresenta grandes vantagens em relação a outros sistemas de propagação, visto que enormes quantidades de embriões podem se formar utilizando-se uma manipulação manual mínima e a utilização de pouco espaço físico (Grattapaglia e Machado, 1998).

A observação de embriões somáticos em cultura de células vegetais foi primeiramente observada por Steward *et al.* (1958) e Reinert (1958), em calos de cenoura (Torres *et al.*, 1998). Sendo que a partir deste período observou-se um número crescente de espécies e tecidos que são utilizados para induzir embriões somáticos. Devido a estes fatores nota-se uma tendência contínua de estudos que buscam obter maior conhecimento sobre o processo e maior habilidade de exploração. Sabe-se que apesar dos embriões somáticos serem originados a partir de células somáticas, estes se assemelham muito aos zigóticos, presumindo-se que possam resultar da expressão gênica que regula a mesma via de desenvolvimento (Parrot *et al.*, 1991).

Os padrões de desenvolvimento de um embrião somático em dicotiledôneas apresentam muitas características morfológicas semelhantes as do embrião zigótico. Ambos são caracterizados pela diferenciação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular. Ambos passam por estádios de desenvolvimento pró-embrionário e embrionário propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Zimmermann, 1993).

Os embriões somáticos diferem dos zigóticos em relação ao desenvolvimento livre de correlações físicas, fisiológicas e genéticas, as quais ocorrem durante o desenvolvimento do embrião zigótico (Zimmermann, 1993). Uma característica peculiar aos embriões somáticos é a presença de sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial. Esta característica, aliada à bipolaridade difere os embriões somáticos dos propágulos resultantes dos processos de micropropagação e organogênese (Guerra *et al.* 1999).

Quanto à forma de ocorrência, a embriogênese somática pode apresentar-se *in vivo* ou *in vitro*. No primeiro caso, células do tecido embrionário podem ser direcionadas para esta rota de desenvolvimento, como acontece com o sistema de embriogenia adventícia ou nucelar em *Citrus* spp., onde embriões apomíticos se originam por gemação a partir de células do nucelo (Spiegel-Roy e Vardi, 1984). A

consequência deste fenômeno é a perpetuação de populações clonais por meio da semente (Zimmermann, 1993; Guerra *et al.* 1999).

Na embriogênese somática *in vitro*, células em diferentes estádios de diferenciação podem ser induzidas por estímulos ambientais ou químicos e, se reprogramadas, podem adquirir novas competências morfogenéticas (Guerra *et.*, 1999).

Segundo Sharp *et al.* (1982, citado por Parrot *et al.* 1991), existem dois padrões básicos da expressão da embriogênese somática *in vitro* o direto e o indireto.

A embriogênese somática direta caracteriza-se por originar os tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calo, sendo exemplos os segmentos de pecíolos ou embriões zigóticos. Segundo Sharp *et al.* (1982), este tipo de padrão ocorre em células nucelares de variedades poliembriônicas de citros, em embriões imaturos de palmeiras (*Euterpe edulis*) (Guerra e Handro, 1988), e em inflorescências de *Euterpe edulis* (Guerra e Handro, 1988). Em estudos desenvolvidos por Almeida (1994), ápices caulinares de pupunha (*Bactris gasipaes*) também apresentaram desenvolvimento direto de gemas e embriões.

Segundo Van der Linde (1990), os padrões diretos de embriogênese somática seriam o resultado de uma ativação de células responsivas contendo receptores para determinados reguladores de crescimento. Estas células seriam rediferenciadas para novas rotas morfogenéticas, gerando células mães embrionárias competentes, capazes de originar populações clonais de células embriogênicas. Os padrões genéticos de embriogênese somática seriam produtos de desdiferenciação ou rediferenciação de células contendo receptores, gerando células de calos.

Williams e Maheswaran (1986), sugeriram que a embriogênese somática direta é precedida por células pré-embriogênicas determinadas (PEDCs), requerendo somente reguladores de crescimento ou condições favoráveis para o início da divisão celular e a expressão da embriogênese. Por outro lado, o termo célula embriogênica determinada induzida (IEDCs) é usado para identificar células capazes

de adquirir o potencial embriogênico durante o período de cultivo. Neste caso, a embriogênese indireta requer a redeterminação de células diferenciadas, a proliferação de calos e o desenvolvimento do estado embriogeneticamente determinado. Segundo Parrot *et al.* (1991), as IEDC e as PEDC são funcionalmente equivalentes e, portanto, o termo célula embriogênica (EC) pode ser adotado.

A forma de expressão indireta, caracteriza-se pela formação de embriões somáticos a partir de calos os quais apresentam células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, as quais podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos. Um exemplo clássico deste sistema de indução da embriogênese somática indireta, ocorre em tecidos do floema de cenoura (*Daucus carota*) cultivadas *in vitro* (Reinert, 1958; Steward, 1958) (Sharp *et al.* (1982), citado por Parrot *et al.* 1991).

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a grande maioria dos sistemas de embriões somáticos ocorre através do modo indireto.

A regeneração de plantas por via indireta após a produção de calos a partir de células foi caracterizado por estudos morfológicos e histológicos realizados por Schumann *et al.* (1995), onde detectaram 3 tipos distintos de tecidos de calos com variações na cor, estrutura e resposta morfogenética. O primeiro tipo apresenta calos compactos (globulares ou nodulares), de cor amarelo claro e denso, constituído de pequenas células isodiamétricas; o segundo tipo descrito apresenta calos irregulares, soltos, consistindo de células glandulares arranjadas sem coesão, quanto a cor são mais semi-transparentes do que os anteriores com regiões densas pouco coloridas e finalmente tecidos de calos irregulares pouco coesos, com células alongadas, tubulares, grandes, translúcidas e não morfogênicas.

De acordo com Schumann *et al.* (1995), somente no primeiro tipo de calo foi observado o desenvolvimento de camadas de células semelhantes ao procâmbio, fato que coincide com a fase de proliferação.

Divisões internas nestas camadas de células simples originam principalmente divisões periclinais, o que pode determinar o início da embriogênese somática em fase subsequente, divisões anticlinais resultam na formação de massas de proembriões. Williams e Maheswaran (1986), demonstraram que o primeiro sinal da embriogênese somática direta é a mudança a partir da divisão anticlinal para a periclinal irregular e divisão oblíqua.

Independente do padrão direto ou indireto, as células mães embriogênicas apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento de células embrionárias em divisão ativa. Estas características incluem: tamanho pequeno (100-200µm), conteúdo citoplasmático denso, núcleo grande com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido. As propriedades histoquímicas destas células sugerem intensa atividade metabólica e síntese de RNA (Williams e Maheswara, 1986).

Em diferentes espécies as necessidades nutricionais têm sido relacionadas com os processos de embriogênese somática (Thorpe, 1983). Diversas formas do íon nitrogênio aplicadas ao meio de cultura estimulam o processo de embriogênese (Higashi *et al.* 1997), assim como o boro, cálcio, potássio e os quelatos de ferro que também interferem no estabelecimento do embrião *in vitro* (Ammirato, 1983).

A composição do meio de cultura com conseqüente análise do consumo de sais, pode otimizar a composição deste possibilitando um melhor controle dos eventos embriogenéticos (Magnaival *et al.*, 1997).

A concentração e o tipo de carboidrato utilizado também parece possuir efeito na embriogênese, porém os trabalhos desenvolvidos não apontam se esta interferência ocorre na iniciação ou desenvolvimento dos embriões (Guerra *et al.*, 1999). A fonte de carboidrato mais utilizada é a sacarose, embora outros mono e dissacarídeos possam ser empregados. Normalmente, concentrações de 3 % (p/v) de sacarose são suficientes para os processos de iniciação e diferenciação (Guerra *et al.*, 1999).

Em adição a estes fatores de ordem nutricional, a relação auxina-citocinina, níveis de fitorreguladores utilizados no meio de cultura, concentração de gases *in vitro*, condições de luz e temperatura, também apresentam limitações ao estabelecimento da embriogênese (Guerra *et al.*, 1999).

Parrot *et al.*, (1995), mencionaram que a exposição a hormônios é um dos mecanismos que influenciam a resposta embriogênica. Uma vez que as EC's foram obtidas, a presença continua de auxinas pode inibir o desenvolvimento normal do embrião somático. Quando as concentrações de auxinas são extremamente altas, o embrião não segue seu desenvolvimento ontogenênico normal, podendo apresentar novos embriões somáticos (Parrot *et al.*, 1991; Guerra *et al.*, 1999). Este fato pode ser denominado como embriogenia secundária recorrente ou repetitiva.

Outras variáveis estão relacionadas a habilidade de regeneração de calos embriogênicos. Kikuchi *et al.* (1995), analisaram polissacarídeos pépticos e compararam calos embriogênicos e não embriogênicos de cenoura e concluíram que os calos embriogênicos formavam um maior número de grupamentos celulares, e que o nível de açúcares neutros era maior em relação aos calos não embriogênicos. Através de cromatografia gasosa puderam observar que calos embriogênicos, bem como os embriões somáticos, apresentavam maiores teores de arabinose, enquanto que calos não embriogênicos eram ricos em galactose.

Yeo *et al.* (1998), analisaram as alterações quantitativas e qualitativas dos polissacarídeos na parede celular durante a embriogênese somática e o desenvolvimento de plântulas de aspargo (*Asparagus officinalis* L.), concluíram que a arabinose foi mais ativamente sintetizada em calos embriogênicos sendo posteriormente degradadas durante o curso da diferenciação.

De acordo com De Vries *et al.* (1988), análises revelaram que um grande número de proteínas extracelulares são excretadas pelas células embriogênicas para o meio de cultura, e que elas podem atuar como marcadores moleculares para distinguir culturas embriogênicas e não embriogênicas; os autores sugerem que

algumas das proteínas apresentam também um importante papel na indução e no desenvolvimento de embriões somáticos.

3.2 Boro

O boro é um micronutriente que pode ser encontrado na forma solúvel e insolúvel dentro dos tecidos foliares, porém em cultura de células a forma solúvel do boro não é encontrada (Hu e Brown, 1994; Matoh *et al.*, 1992) uma vez que localiza-se na região do apoplasto, no entanto a forma insolúvel associa-se a rhamnogalacturonanas II (RG-II) da parede celular (Matoh, 1997).

Segundo Malavolta (1980), o boro possui mobilidade muito baixa dentro dos tecidos vegetais sendo absorvido pelas plantas na forma H_3BO_3 ou $H_2BO_3^-$. É um micronutriente de grande importância para as plantas superiores embora sua concentração nos tecidos foliares sadios não ultrapasse os 100 ppm (peso seco).

Os estudos do papel do boro na nutrição e fisiologia de plantas iniciaram-se na década de 20 com Warington (Hu e Brown, 1994; Bonilla *et al.*, 1995; Matoh, 1997), entretanto o conhecimento de sua função exata no metabolismo das plantas não foi bem definido até a presente data (Matoh *et al.*, 1992; Bonilla *et al.*, 1995; Matoh *et al.*, 1996; Bonilla *et al.*, 1997).

Especula-se que algumas das prováveis implicações do boro na célula vegetal sejam: divisão celular, aumento no tamanho das células, transporte de carboidratos da folha para outros órgãos (Malavolta, 1980) e atuação como agente morfogenético (Spurr, 1957). Sua participação no desenvolvimento da parede celular é muito importante influenciando suas propriedades físicas, ultraestruturais e diferenciação (Yamauchi *et al.*, 1986; Teasdale *et al.*, 1990; Matoh *et al.*, 1992; Hu e Brown, 1994). Diversos estudos têm sugerido que o boro atua na biogênese da parede celular das plantas. No entanto alguns autores discordam ao considerarem qual as

funções primárias do micronutriente. Lewis (1980), acredita que o boro esteja envolvido na biossíntese de lignina e diferenciação do xilema.

Segundo Parr e Longhman (1983), outras desordens metabólicas podem ser apontadas como consequência da deficiência de boro, são exemplos a redução no transporte de açúcar, diminuição da lignificação, danos à síntese e estrutura da parede celular, decréscimo no metabolismo de carboidratos, diminuição da síntese de RNA, queda nas taxas respiratórias e ainda a diminuição do metabolismo do ascorbato (Lukaszewski e Blevins, 1996). Lovatt (1985), indica que reações enzimáticas são alteradas e Pilbeam e Kirkby (1983), sugerem o envolvimento do íon na estabilização da membrana plasmática sendo muitos sintomas destas deficiências efeitos secundários causados por mudanças na permeabilidade da membrana, porém tanto a deficiência como a toxidez do micronutriente causam anomalias no corpo vegetal.

A existência de um provável envolvimento do elemento na constituição de unidades estruturais básicas da parede celular são destacadas por Teasdale e Richards (1990). Evidências apresentadas por Hu e Brown (1994), mostraram que o boro está fisicamente localizado e é estruturalmente importante para a parede celular, suportando a hipótese proposta por Skok (1957), de que o boro está envolvido na formação de unidades estruturais ou “building blocks” da parede celular mais do que em reações metabólicas denotando um estreito relacionamento do íon com mecanismos de crescimento e desenvolvimento do corpo vegetal.

As anormalidades são uma consequência secundária da deficiência do elemento que têm sido avaliadas pelas mudanças visíveis nas atividades metabólicas e/ou morfológicas. Por isso, estes são os meios mais importantes para detectar as manifestações iniciais da deficiência de boro (Matoh *et al.*, 1992).

A deficiência do elemento resulta em uma inibição rápida do crescimento da planta (Hu e Brown, 1997). A função estrutural do boro na parede celular explica as observações bem conhecidas de que o boro não é reutilizável e pode ser suplementado constantemente durante o crescimento da planta (Skok, 1957).

Pilbean e Kirkby (1983), observaram que a deficiência de boro nas plantas aparece primeiro como crescimento anormal ou retardado dos pontos de crescimento apical, ou interrupção do crescimento do tubo polínico. Marschner (1995), descreveu os sintomas de deficiência de boro e observou o encurtamento de internódios, clorose de folhas velhas, deformação da lâmina foliar, aumento do diâmetro do pecíolo e do caule, diminuição na formação do botão floral, flores e desenvolvimento do fruto. Estes sintomas visuais são também observados por Mengel e Kirkby (1987), que confirmam a ocorrência do crescimento anormal da planta assim como o retardamento no crescimento da região apical.

Anormalidades estruturais também são causadas pela deficiência de B, especialmente na parede celular (Matoh, 1997). Em abóbora (*Curcubita pepo*) e girassol (*Helyanthus* sp.), a falta de B resulta em uma rápida inibição do crescimento da raiz e brotos meristemáticos, caracterizando a requisição primária do elemento no crescimento da célula (Loomis e Durst, 1992).

Em cultura *in vitro* de 3 híbridos de *Eucalyptus*. Higashi (1996), observou que a deficiência visual de boro apresentou como sintomas mais comuns à redução da área foliar, deformação das folhas e clorose das nervuras.

A toxidez por boro causa um crescimento limitante de vegetais em solos áridos e semi-áridos ao redor do mundo. Existem poucas áreas com excesso de boro comparando-se com solos deficientes, sendo que os maiores depósitos de B_2O_3 encontram-se na Califórnia. Altas concentrações de boro podem ocorrer naturalmente no solo ou na água do solo ou por adição de fertilizantes ou irrigação (Nable *et al.*, 1997).

Entre as espécies de plantas, um sintoma típico da toxidez de boro é a queima- áreas cloróticas ou necróticas, muitas vezes em margens e pontas de folhas velhas, porém este não é um sintoma comum a todas as espécies. Em espécies onde o B é translocado pelo floema, como *Prunus*, *Malus*, *Pyrus*, o íon se acumula mais no desenvolvimento de drenos, sendo que os sintomas mais comuns são desordens

dos frutos, necrose da casca e morte de tecidos cambiais e caule (Brown e Hu, 1996).

Sintomas de toxidez não são visíveis em raízes. Em plantas jovens de abóbora (*Curcubita pepo*), um efeito da toxidez de boro é o decréscimo da concentração de clorofila, seguida pela redução no crescimento, decréscimo da área foliar e queda na fixação de CO₂. Altas concentrações de boro também podem inibir o metabolismo do ureídeos nas folhas de soja nodulantes (Luzaszewski *et al.*, 1992) e a complexação de ribonucleotídeos os quais causam distúrbios metabólicos (Loomis e Durst, 1992). O encurvamento das folhas, em algumas espécies é um sintoma visível da toxidez, sugerindo a inibição da parede celular, através de distúrbios de ligações presentes na parede celular (Loomis e Durst, 1992).

Spurr (1957), demonstrou que o boro aparentemente afeta a taxa e o processo de condensação de carboidratos dentro do material da parede. Muitas células do colênquima faltam no desenvolvimento típico da espessura e em seu lugar forma-se uma camada sólida do material da parede. Estas mudanças anatômicas na parede celular convencem que o boro é um agente morfogenético que afeta o desenvolvimento da forma específica da parede celular em plantas superiores.

A localização intracelular do boro ocorre essencialmente na parede celular, ocorrendo na forma ligada com uma fração de pectinas, conhecidas como rhamnogalacturonanas-II (RG-II) (Hu e Brown, 1994; Kobayashi *et al.*, 1996; Ishii e Matsunaga, 1996).

Em cultura de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e abóbora (*Curcubita pepo*) foram detectadas quantidades superiores a 90% do elemento na parede celular (Matoh *et al.*, 1992; Hu e Brown, 1994; Nguyen *et al.*, 1995), caracterizando a sua localização intracelular. Segundo Matoh *et al.* (1992), o elemento é encontrado em quantidades muito pequenas no simplasto.

A maioria do boro da parede celular (> 70%) está associado com pectinas (Hu e Brown, 1994; Matoh *et al.*, 1993). É amplamente aceito que as pectinas têm um papel chave na determinação da extensibilidade plástica da parede celular dos

vegetais (Jarvis, 1984) e sob deficiência de boro as propriedades físicas da parede celular são notavelmente alteradas, correlacionando com a rápida expansão da célula (Hu e Brown, 1994).

Pectinas são complexos, ramificados de polissacarídeos ácidos que estão localizados em toda a matriz da parede celular de plantas. A estrutura das pectinas na parede celular tem sido descrita como blocos onde existem regiões lisas e lanosas (de Vries *et al.*, 1982 citado por Arland *et al.*, 1996). As regiões de pectinas lisas consistem de homogalacturananas (McNeil *et al.*, 1984) e as regiões lanosas consistem de rhamnogalacturonanas-I (RG-I), rhamnogalacturonanas-II (RG-II), xylogalacturonanos e RG com arabinanos (Arland *et al.*, 1996).

Os polissacarídeos pécticos são um grupo rico em ácido galacturônico, rhamnose, arabinose e galactose. Eles são característicos da lamela média e da parede celular primária de plantas dicotiledôneas sendo menos freqüentes em monocotiledôneas (Brett e Waldron, 1996).

As RG-II, são um mega oligossacarídeo péctico que estão relacionadas com a estrutura primária da parede celular de plantas superiores apresentando a mesma estrutura em todas as espécies de plantas das quais ela tem sido isolada (Mazeau e Pérez, 1998). Registros recentes tem mostrado que ela é um grande candidato a complexação do borato de modo que o boro pode se ligar na parede celular através das RG-II. Como o boro é um micronutriente essencial as plantas, Mazeau e Pérez (1998), sugerem uma óbvia importância biológica das RG-II na complexação do micronutriente dentro da parede celular de vegetais.

Em cultura de células em suspensão de dicotiledôneas, as RG-II são os menores componentes de paredes primárias. Quando isoladas, elas apresentam um grau de polimerização de cerca de 60, e possuem uma estrutura complexa a qual inclui ácido galacturônico, rhamnose, arabinose e galactose na razão de 10:7:5:5 junto com pequenas quantidades de alguns açúcares raros como o ácido acérico, apiose e ácido 3-deoxy-manno-octulosônico (KDO) (Arland *et al.*, 1996), metil-fucose e metil xilose (Brett e Waldron, 1996).

Loomis e Durst (1992), propuseram que ésteres de borato com apiose (complexos presentes preferivelmente em RG II) são os responsáveis por ligações cruzadas de polímeros da parede celular e, portanto são extremamente necessários para a estabilidade da parede celular. As ligações com estas pectinas também denotam certa extensibilidade plástica à parede celular e sob condições de deficiência a expansão celular fica inibida (Yamauchi *et al.*, 1986; Matoh *et al.*, 1993; Hu e Brown, 1994).

Kobayashi *et al.* (1996), determinaram através de métodos calorimétricos e GLC a composição de complexos boro-polissacarídeo (BPC) em paredes celulares de rabanete (*Raphanus sativus*). Os autores observaram que o BPC é composto de 3% de 2-O-methylfucose, 8% de Rhamnose, 2% de Fucose, 4% de 2-O-metilxilose, 1% ácido acérico, 7% de arabinose, 12% de apiose, 7% de galactose, 5% 2-keto-3-deoxi açúcares (Kdo) e 51% de ácido galacturônico.

O papel do complexo B-pectina na formação da parede celular sustenta uma explicação para a diferenciação de tecidos que precisam de boro dentro de plantas superiores (Loomis e Durst, 1992). Em paredes celulares primárias de gramíneas monocotiledôneas existem pequenas quantidades de pectinas (Darvill *et al.*, 1980) e tem uma pequena exigência de boro ($3-10 \mu\text{g B g}^{-1}$ de peso seco, Jones *et al.*, 1991). As paredes celulares primárias de dicotiledôneas são caracterizadas pelo alto conteúdo de polissacarídeos pécticos (Darvill, 1980), e necessitam de um suprimento de boro muito maior do que em monocotiledôneas gramíneas ($20-30 \mu\text{g B g}^{-1}$ de peso seco, Jones *et al.*, 1991).

Yamauchi (1971), registrou a relação entre pectina da parede celular e concentração de boro nos tecidos encontrando uma correlação positiva entre boro insolúvel em água e protopectinas contidas em 33 espécies de plantas.

A formação de complexos de boro insolúveis na parede celular de plantas sugere que a absorção do boro por raízes e na extensão da remobilização do boro dentro de brotos (Brown e Hu, 1994; Shelp, 1993). Isto sugere que a formação de complexos de boro insolúvel está associada com a deficiência de boro em um grande

número de espécies. Hu e Brown (1994) e Matoh *et al.*, (1993) indicaram que a maior forma de boro insolúveis em plantas estão na forma de complexo boro-pectinas.

Hu *et al.* (1996), ao testarem 14 espécies com diferentes exigências de boro observou que há uma diferença significativa na resposta das espécies quando privadas de boro. E também observou que existe uma correlação positiva entre o conteúdo de boro existente nos tecidos e a quantidade de ácido urônico presente na parede celular. Quando o micronutriente foi omitido do meio de cultura as quantidades do nutriente diminuíram nos tecidos foliares ao passo que as concentrações de ácido urônico presentes na parede celular não apresentaram mudanças. Em soluções com 0 M de boro, todo o boro presente nos tecidos esta relacionado com a parede celular.

Estes dados corroboram os resultados apresentados por alguns autores que concluíram que 95-98% do boro presente em plantas deficientes estão presentes na parede celular (Hu e Brown, 1994 e Matoh *et al.*, 1992).

Hu *et al.* (1996), ainda observaram que quando o boro é omitido do meio de crescimento, a concentração de boro foliar era muito baixa. Entretanto, a quantidade de ácido urônico da parede não foi reduzida sugerindo que o conteúdo de pectina que existe na célula não é alterado pela deficiência de boro. No entanto, a deficiência de boro inibe rapidamente o crescimento de novas plantas portanto o micronutriente deve estar envolvido no processo de divisão celular, expansão celular ou síntese da parede celular (incluindo pectinas) (Hu e Brown, 1994). Quando o suprimento de boro é aumentado de 0 para 50nM ocorre um aumento 3 vezes maior na concentração de boro nos tecidos e na parede celular de todas as espécies analisadas. Este aumento uniforme do boro na parede celular, que é proporcional ao conteúdo de pectinas sugere que o conteúdo de cada pectinas pode ligar o boro adicional se este estiver presente. Entretanto, quando este é suplementado com quantidades adequadas (50nM) uma porção do boro não se encontra ligada as pectinas da parede celular enquanto em plantas deficientes todo o boro presente se

associa com a fração de pectinas e esta indisponível para a translocação ou uso em outras reações metabólicas.

Hu *et al.* (1996), analisaram diversos açúcares (arabinose, fucose, galactose, glucose, manose, rhamnose e xilose), onde somente rhamnose e galactose mostraram uma correlação positiva com o boro da parede celular. Com exceção de rhamnose em cenoura, a reação entre o boro da parede e rhamnose e galactose assemelha-se com o boro da parede e ácido urônico. Depois que rhamnose e galactose são predominantemente encontradas em associação com resíduos de ácido urônicos os resultados servem para comparar a hipótese de que o boro esta largamente associado com pectinas na parede celular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Para o presente estudo foram utilizadas sementes de *Eucalyptus urophylla* fornecidas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), catalogadas como T8A32, lote NA 416 e coletadas da população base de Anhembi, SP.

4.1.1 Desinfestação de sementes

As sementes foram acondicionadas em saquinhos de nylon e lavadas diversas vezes em água corrente e detergente neutro, sendo transferidas posteriormente para álcool etílico 100% por 3 segundos. Após este processo, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial 70% (V/V) e deixadas sob agitação por 20 minutos.

Em câmara de fluxo laminar as sementes desinfestadas foram lavadas 3 vezes em água deionizada, em seguida foram retiradas dos saquinhos e transferidas para frascos esterilizados contendo meio nutritivo destinado à germinação (20 g de sacarose, 6 g de ágar diluídos em 1000 mL de água destilada deionizada sendo a solução autoclavada por 20 minutos).

4.1.2 Inoculação das sementes

Em cada frasco foram acondicionadas aproximadamente 30 sementes, sendo que estas foram mantidos em câmara de crescimento sob condições constantes de

luz (intensidade luminosa de 3000 lux) e temperatura ($26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) com fotoperíodo de 12 horas. O processo de germinação das sementes ocorreu durante o terceiro dia da inoculação e no décimo segundo dia os hipocótilos foram coletados e utilizados para posterior indução de calos.

4.1.3 Explantes

Os hipocótilos das plântulas foram excisados em sua região mediana com comprimento aproximado de 0,5 cm.

4.1.4 Meios de cultura para indução de calos

Utilizou-se para a indução dos calos o meio de cultura N7 (Simola, 1985), suplementado com 5 mg.L^{-1} Picloram e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de caseína hidrolizada. Os calos foram cultivados por doze dias e posteriormente transferidos.

4.1.5 Meios de cultura com diferentes concentrações de boro

Os calos induzidos foram transferidos para meio de cultura N7 (Simola, 1985), contendo concentrações de boro na forma de H_3BO_3 (ácido bórico), descritas na Tabela 1. Para cada tratamento, foram utilizadas 3 placas de Petri com 12 calos, totalizando 36 calos para cada concentração de boro utilizada. Os calos foram avaliados após 21 dias de cultivo.

Tabela 1- Tratamentos empregados e doses de boro em mM

TRATAMENTOS	mM DE BORO
1	0
2	25
3	50
4	100
5	200

4.2 Avaliação de calos obtidos

4.2.1 Avaliação morfológica e determinação de massa fresca em calos de *E. urophylla*

Os calos de *E. urophylla* foram analisados quanto a morfologia externa, resposta morfogenética e também quanto ao aumento de massa fresca em meio de cultura N7 (Simola, 1985) suplementado com Picloran e caseína hidrolisada, como forma de avaliar o desenvolvimento e determinar o melhor período para a realização de análises bioquímicas e anatômicas. Estes foram retirados do meio de cultura e pesados em balança analítica.

4.2.2 Determinação de massa fresca e seca de calos com diferentes concentrações de boro

Ao fim do vigésimo primeiro dia os calos cultivados com as concentrações de boro determinadas foram avaliados quanto ao seu conteúdo de massa fresca e seca.

Os calos foram retirados do meio de cultura e pesados em balança analítica tendo a sua massa fresca registrada. Posteriormente estes foram conduzidos a estufa (105°C), por 24 horas para a determinação de sua massa seca.

4.3 Determinação de carboidratos não estruturais totais (Método de Antrona - Yemm e Willis, 1954)

4.3.1 Preparo dos reagentes e extração

Para cada tratamento foram pesados 350 mg de calos (massa fresca). As amostras foram maceradas em cadinho de porcelana com 10 mL de etanol 80% (V/V) e posteriormente filtradas com papel filtro. O volume recolhido foi mantido em estufa a 60° C até a evaporação total do etanol. Após a evaporação, o material aderido ao fundo do recipiente foi resuspenso em 30 mL de água destilada deionizada e mantido sob agitação em shaker rotatório por 20 minutos.

Em capela, o reagente de antrona foi preparado com 100 mg de antrona diluída em 45 mL de ácido sulfúrico concentrado e 5 mL de água destilada deionizada. Agitações eventuais foram feitas até que a temperatura da solução regredisse a valores próximos ao ambiente (aproximadamente 30 minutos).

4.3.2 Análise das amostras de carboidratos não estruturais totais

Preparou-se uma curva de calibração com glicose respeitando-se as seguintes concentrações: 0, 50, 75, 100, 150, 175 e 200 mg glicose.L⁻¹, com duas repetições por amostra. Foram pipetados em tubos de ensaio 1 mL de cada amostra padrão e 7 mL do reagente de antrona. As amostras foram homogeneizadas e em seguida aquecidas até o ponto de ebulição por 10 minutos. Transcorrido o tempo determinado às amostras foram prontamente resfriadas em banho de gelo.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 625 nanômetros como forma de se obter a curva analítica de calibração e a equação da reta.

As amostras com diferentes concentrações de boro foram posteriormente lidas em espectrofotômetro posteriormente, considerando-se 3 repetições para cada tratamento.

A equação da reta obtida com a curva de calibração possibilitou a estimativa da concentração de carboidratos não estruturais totais (mg de glicose.g⁻¹ em massa vegetal fresca) em relação a concentração de boro presente em cada tratamento utilizado.

4.4 Quantificação de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

4.4.1 Preparo de reagentes e extração de proteínas totais

Para a quantificação protéica foram preparados os seguintes reagentes: solução estoque de albumina bovina (BSA), constituída de 0,5 mg de BSA diluída em 1mL de NaCl 0,5 M; solução estoque de Coomassie Brilliant Blue G 250 composto de 100 mg de Coomassie Brilliant Blue, diluído em 50 mL de etanol e 100mL de ácido fosfórico concentrado sendo o volume completado com água destilada deionizada até 1000mL e solução de extração composta de 4 mL de tampão Tris-HCl (pH 6.8), 1,6 mL de mercaptoetanol, 6,4 mL de SDS 10% (P/V), 6,4 mL de glicerol, 3,2 mL de DMSO, 1 g de PVP e 10,4 mL de água destilada deionizada. Todo o procedimento foi realizado em capela.

Calos com 320 mg de massa fresca foram maceradas em cadinho de porcelana com 5mL de solução de extração. O material vegetal macerado permanecendo em reação à temperatura ambiente (24° C $\pm$ 2° C) por 1 hora sendo aquecidas posteriormente até o ponto de ebulição por 3 minutos.

As amostras que sofreram reações foram resfriadas, acondicionados em Eppendorfs de 1,5 mL e subsequêntemente centrifugados a 12.000 rpm durante 300/s. Utilizou-se para a quantificação de proteínas totais apenas a porção sobrenadante.

Aliquotas deste mesmo sobrenadante foram utilizados na eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, descrito na seção 5.6

4.4.2 Análise das amostras de proteínas totais

Primeiramente determinou-se a curva analítica de calibração com concentrações determinadas de albumina (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140 e 150 mg de albumina. L⁻¹). Para cada concentração foram adicionados 500 µL de solução de NaCl 0,5M e 5 mL de Coomassie. Leituras foram feitas em espectrofotômetro a 595 nanômetros e a partir destas tornou-se possível obter a equação da reta.

Para a quantificação dos teores de proteínas totais nas amostras foram adicionadas 50 µL de amostras com diferentes concentrações de boro a 4,5 mL de solução de Coomassie procedendo-se à leitura a 595 nm.

4.5 Avaliação de prolina (Bates, 1973)

4.5.1 Extração e preparo dos reagentes

Para a extração de prolina foram macerados em cadinhos de porcelana 500mg de material vegetal fresco de cada tratamento, em solução 3% de ácido sulfossalicílico.

Após a maceração, 2mL de cada solução referente aos tratamentos propostos foram filtradas e os sobrenadantes resultantes foram adicionados a 2 mL de ácido acético glacial e 2mL de ninidrina ácida.

As amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio tampados sendo aquecidos posteriormente em estufa a 100°C por 1 hora e resfriadas em banho de gelo após este período.

4.5.2 Análise das amostras de prolina

Primeiramente efetuou-se a curva analítica de calibração com duas repetições para cada concentração utilizada. A curva foi estabelecida em espectrofotômetro com leituras realizadas a 520 nm de onde se obteve a equação da reta através da qual pode-se avaliar o teor de prolina presente nos calos de *E. urophylla*.

Para a quantificação de prolina nas soluções de calos, as análises foram feitas em triplicata e as amostras foram preparadas de acordo com o procedimento previamente descrito no item 4.5.1, sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro a 520 nm .

4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para proteínas totais

4.6.1 Extração das proteínas

Os mesmos extratos obtidos para a quantificação de proteínas totais descritos anteriormente (seção 4.5.1) também foram utilizados neste procedimento.

4.6.2 Preparo dos géis de poliacrilamida

Foram preparados dois géis para a realização deste procedimento, o gel de corrida que compõe a maior parte da placa e o “stacking”, utilizado apenas na porção superior das placas onde se formam reentrâncias onde foram inseridos os extratos protéicos.

Para o gel de corrida foram utilizados 4,7 mL de água destilada deionizada, 5 mL de tampão tris-HCL (pH 6.8), 10 mL de acrilamida, 100 µL de APS, 20 µL de

TEMED e 100 μ L de SDS (10%) e para o gel “stacking” utilizou-se para o preparo da solução 9,3 mL de água destilada deionizada, 1,9 mL de tampão tris-HCL (pH 6.8), 2,0 mL de APS, 100 μ L de SDS (10%) e 15 μ L de TEMED.

Em cada orifício formado no gel “stacking” foram adicionados 15 μ L de extrato protéico. Após este procedimento os géis foram acondicionados em cubas de eletroforese contendo solução tampão de corrida (10 mL de Tris-HCL pH 8,3 em 490 mL de água destilada deionizada). A corrida do gel foi realizada em geladeira utilizando-se uma fonte para eletroforese (Pharmacia EPS 300) com corrente elétrica de 40 mA por um tempo aproximado de 2h.

4.6.3 Revelação e coloração dos géis

Após a corrida, os géis foram retirados da cuba de eletroforese e lavados por 3 vezes com água destilada deionizada sendo mantidos sob agitação durante este processo.

Os géis foram revelados em solução reveladora, e corados com solução corante (0,15 de phastgel blue R e ácido acético 20% V/V) até o aparecimento das bandas.

O armazenamento foi feito em água destilada deionizada e o procedimento de análise ocorreu em analisador de imagens com posterior registro fotográfico.

4.7 Extração de componentes da parede celular

4.7.1 Extração da parede celular de calos de *E. urophylla*

Os procedimentos descritos na seção 5.7 e suas subseções serão utilizados para na análise de pectinas (seção 5.8) e ácido urônico (seção 5.9).

Amostras de calos de *E. urophylla* foram trituradas por 6 vezes em macerador Ultra-ultrax T25 juntamente com 25 mL de etanol 70% e posteriormente sonicados por 3 vezes (para garantir o total extravasamento do conteúdo celular) permitindo a análise de somente componentes da parede celular.

O material resultante foi centrifugado 8 vezes a 6.000 rpm por 10 minutos a temperaturas de ± 5 °C sendo o sobrenadante descartado e a porção sólida homogeneizada com mais 25 mL de álcool etílico. A solução foi centrifugada exaustivamente até que o sobrenadante estivesse completamente límpido.

4.7.2 Extração de resíduos sólidos insolúveis em álcool (AIR)

O precipitado resultante desta extração foi homogeneizado com 10 mL de metanol e 10 mL de clorofórmio, na proporção 1:1, sendo as amostras filtradas em bomba a vácuo por 5 vezes. As amostras foram lavadas com 5 mL de acetona absoluta por 2 vezes e levadas a estufa a 60° C por 24 horas.

Após este período as paredes foram maceradas em cadinhos de porcelana e pesadas para se determinar o rendimento expresso em porcentagem de parede celular obtida em cada tratamento.

4.7.3 Fracionamento da parede celular

Alíquotas de 40 mg de parede celular, obtidas com a extração de resíduos sólidos solúveis foram adicionadas a 4 mL de oxalato de amônio 0,5M. As amostras foram tampadas e aquecidas a 80°C por 1 hora permanecendo sob constante agitação. A solução resultante da filtragem foi adicionada a 4 mL de oxalato de amônio e sofreu novo aquecimento a 80 °C. O volume da solução foi medido e em seguida as amostras foram dialisadas por 48 horas a 10°C.

4.7.4 Colunas de Sephadex G-25

Colunas de Sephadex G-25 foram montadas em êmbolos de seringas descartáveis com capacidade para 3mL.

As colunas foram lavadas diversas vezes com água destilada e em seguida adicionou-se o corante “blue dextran” à coluna que serviu como marcador da capacidade volumétrica da coluna (volume vazio).

Após a passagem de todo o corante pelo gel, 500 μ L das soluções dialisadas foram pipetadas em cada coluna juntamente com água destilada até que atingissem o volume vazio correspondente.

As amostras coletadas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos antes de serem analisadas.

4.8 Análise de pectinas (açúcares totais em paredes de calos de *E. urophylla* - Método fenol-sulfúrico-Dubois *et al.*, 1956)

4.8.1 Extração e preparo dos reagentes

Os açúcares presentes nas paredes celulares foram extraídos através de uma série de procedimentos descritos anteriormente na seção 5. 7 e suas subseções.

4.8.2 Análise das amostras de pectinas

Preparou-se a uma curva de calibração com glicose respeitando-se as seguintes concentrações: 0, 10, 20, 30, 40, 50 mg glicose.L⁻¹, com duas repetições por amostra. Para cada tubo de ensaio pipetou-se 100 μ g. L⁻¹ de solução padrão de

glicose em 0,5 mL de fenol e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e completou-se o volume com 0,5 mL de água destilada.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 490 nanômetros como forma de se obter a curva analítica de calibração e a equação da reta.

As amostras com diferentes concentrações de boro foram lidas em espectrofotômetro posteriormente, considerando-se 3 repetições para cada tratamento. Foram pipetadas 50 μ L de amostra mais 450 μ L de água destilada, 50 μ L de fenol e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

A equação da reta obtida com a curva de calibração possibilitou a estimativa da concentração de açúcares totais da parede celular de calos sendo expressos em porcentagem de pectina para cada concentração de boro utilizada.

4.9 Quantificação de ácido urônico (Fry *et al.*, 1988)

4.9.1 Extração e preparo dos reagentes

Os ácidos urônicos presentes nas paredes celulares foram extraídos através de uma série de procedimentos descritos na seção 4. 7 e suas subseções.

As amostras obtidas através dos procedimentos descritos passaram por processo de liofilização como forma de se concentrar o material possibilitando uma posterior leitura em espectrofotômetro.

4.10 Estudos anatômicos e morfológicos de calos de *E.urophylla* cultivados sob concentrações de boro

Os diferentes tratamentos contendo concentrações determinadas de boro foram coletados aos 21 dias e fixados por 48 horas em solução de Karnovski (Karnovski, 1965). Estas amostras foram então levadas a uma bomba a vácuo para a retirada do ar dos espaços intercelulares.

Depois de infiltradas as amostras foram desidratadas através de uma série alcoólica-etílica composta de concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%V/V), permanecendo em cada uma delas por 10 minutos.

Uma vez desidratadas as amostras foram infiltradas em resina glicol metacrilato da Reichert-Jung. Os blocos resultantes foram seccionados a 0,5 μ m de espessura através de navalhas de aço do tipo C acopladas a micrótomo rotativo manual.

Os cortes foram posteriormente corados com azul de toluidina 0,05 % em tampão fosfato e ácido cítrico (Sakai, 1973) por 15 minutos e montados em resina sintética Entellan (Merck).

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico acoplado a analisador de imagens.

4.11 Análises dos dados

O experimento foi montado no delineamento experimental inteiramente ao acaso com 5 tratamentos e 3 repetições.

Os valores de absorbância foram substituídos na fórmula obtida através de regressão linear simples entre os valores da absorbância e as concentrações conhecidas do padrão utilizado

Os dados foram submetidos a análise de variância (teste F) e comparação entre médias pelo teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Material vegetal

As sementes utilizadas apresentaram viabilidade satisfatória possibilitando a realização dos ensaios. O processo de seleção utilizado pelo IPEF é muito rigoroso e as sementes são provenientes de áreas conhecidas impossibilitando incompatibilidades intraespecíficas resultando na alta qualidade destas.

O método utilizado para a desinfestação foi eficiente, fato que eliminou a presença de agentes infectantes. Após a inoculação em meio de germinação o índice de contaminação foi de 0%. Este tipo de procedimento é amplamente utilizado no Laboratório de Fisiologia das Árvores (LAFISA-ESALQ/USP) e na maioria dos casos os índices de contaminação obtidos correspondem aos apresentados neste ensaio.

O número de sementes dispostas em cada frasco foi satisfatório, uma vez que as sementes ficaram distribuídas de maneira uniforme na superfície do meio de cultura. Quantidades superiores poderiam gerar competições nutricionais impedindo o crescimento posterior das plântulas.

Em meio de indução os hipocótilos obtiveram alta taxa de resposta o que possibilitou a obtenção de calos em tempo reduzido. Cerca de 95% dos hipocótilos excisados resultaram em estruturas de calo. Em cultura de células e tecidos diversas formas de explantes podem ser utilizadas como forma de induzir a calogênese, no entanto de acordo com os dados obtidos por Arruda (2000), estes tipos de explante indicaram uma boa viabilidade, justificando o seu uso na indução de calos de *E. urophylla*.

O meio N7 (Simola, 1985), mostrou balanço nutricional adequado onde doses minerais supriram de forma apropriada o crescimento da espécie estudada, no entanto a iniciação de calos só ocorreu quando se adicionou ao meio caseína hidrolisada e altas doses de auxina (5 mgL^{-1} de Picloran). Este tipo de meio também favorece a iniciação de calos de magagametofitos de *Picea abies* (Simola e Honkanen, 1983).

5.2 Avaliação de calos obtidos

5.2.1 Avaliação morfológica e determinação de massa fresca em calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 (Simola, 1985) com Picloran e caseína hidrolisada

O crescimento dos calos, em massa fresca (g), encontram-se expressos na Tabela 2 e Figura 1. Através destas é possível verificar um aumento significativo dos valores de massa fresca principalmente aos 14 e 21 dias. As massas registradas aos 21 e 28 dias no entanto são aproximadamente duas vezes maiores do que as apresentadas aos 14 dias.

A análise das duas últimas datas (21 e 28 dias) não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, porém segundo vários autores (Komanine *et al.*, 1990; Guerra *et al.*, 1999), a exposição de calos em tempos prolongados a altas doses de auxinas prejudica o desenvolvimento posterior de embriões somáticos. Considerando-se este fato, optou-se por transferir os calos aos 21 dias de cultivo para meios com concentrações distintas de boro.

Tabela 2 Variação na massa fresca de calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com adição de Picloran e caseína hidrolisada

DIAS	MASSA FRESCA (g)
0	0,0033 c
7	0,0575 c
14	0,5357 b
21	0,9893 a
28	1,0669 a

Figura 1. Variação na massa fresca de calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com adição de Picloran e caseína hidrolisada

Organograficamente foram observadas mudanças estruturais na forma e cor dos calos durante os dias de cultivo (Tabela 3).

A coloração vermelha inicial dos hipocótilos recém inoculados apresentou mudanças para a cor verde médio após 7 dias da inoculação com formação inicial de

calos nas extremidades laterais dos segmentos. Neste período ocorreu predominantemente crescimento em comprimento com manutenção das formas lineares iniciais dos hipocótilos.

O intumescimento das regiões medianas dos hipocótilos ocorreu após 14 dias, fato que ocasionou o primeiro aumento significativo da massa fresca (Tabela 2 e Figura 1).

No vigésimo primeiro dia, houve o estabelecimento de estruturas de calos com formas globulares, friáveis e de cor amarela características. Divisões celulares foram maiores neste período o que acarretou em aumento significativo da massa fresca em relação ao décimo quarto dia. Após vinte e oito dias, os calos ainda apresentaram certa friabilidade e cor amarela porém pontos oxidados foram observados na superfície.

Os resultados encontrados confirmam as observações de Arruda (2000), que também observou variações na morfologia externa de calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 suplementado com Picloran e caseína hidrolisada .

Tabela 3. Análises morfológicas semanais em calos de *E. urophylla* induzidos em meio N7 com adição de Picloran e caseína hidrolisada.

DIAS APÓS A INOCULAÇÃO	COLORAÇÃO DOS SEGMENTOS	MORFOLOGIA EXTERNA
0	VERMELHO	Hipocótilos recém inoculados
7	VERDE MÉDIO	Hipocótilos com ligeiro entumescimento nas extremidades dos segmentos; Crescimento predominantemente em comprimento.

14	VERDE CLARO	Hipocótilos entumescidos em regiões medianas e extremidades; Crescimento em comprimento mais evidente.
21	AMARELO	Indução de calos. Perda da forma linear do segmento inoculado devido ao entumescimento generalizado. Aspecto globular agregado assemelhando-se a uma superfície enrugada .
28	AMARELO	Manutenção da forma globular agregada, porém a superfície apresenta um enrugamento mais acentuado. Alguns pontos de oxidação

5.2.2 Determinação de massa fresca e seca de calos com concentrações de boro

Através da análise da variância entre as médias dos diferentes tratamentos, pode-se verificar que existem diferenças significativas entre os ensaios, onde letras iguais indicam igualdade entre as concentrações de boro empregadas.

Observando a Tabela 4, verifica-se que o tratamento 50 diferiu estatisticamente dos tratamentos 0 e 200 mM de B.

Doses intermediárias (25 e 100 mM) não diferiram significativamente da dose padrão e das doses extremas.

As variações na massa fresca de calos relacionam-se com o conteúdo total de água. Deficiência e toxidez do micronutriente causam um decréscimo neste

conteúdo total de água, provavelmente devido as baixas taxas de crescimento dos calos e estresse hídrico. Sharma e Rhamchandra (1990), estudando a relação da deficiência de boro com o peso fresco em folhas de mostarda (*Brassica campestris* L. cv. T 42) obtiveram dados semelhantes aos observados neste ensaio, e concluíram que doses deficientes do elemento causaram estresse hídrico nestas plantas.

A Figura 2, mostra a variação na massa fresca de calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

Tabela 4. Variação na massa fresca de calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

TRATAMENTOS (mM de boro)	MASSA FRESCA (g)
0	1,5160 b
25	2,0320 ab
50	2,4097 a
100	1,8123 ab
200	1,6457 b

Figura 2. Variação na massa fresca de calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

Em relação ao conteúdo de massa seca somente o tratamento 50 mM de boro diferiu significativamente dos demais, apresentando valores duas vezes maiores.

O maior conteúdo de massas frescas e secas dos calos foram encontrados no tratamento com 50 mM de boro (Tabela 4 e Figura 2) e seca (Tabela 5 e Figura 3). A massa fresca e seca dos calos apresentou um acréscimo no seu conteúdo com o aumento das concentrações de boro e decréscimo com doses superiores a 50 mM

A queda no conteúdo de massa seca em plantas crescidas com níveis deficientes de B foi registrada por diversos autores (Sharma e Ramchandra (1990); Rocha Fº, *et al.*, 1978) que também observaram um pico significante na presença de doses suficientes do micronutriente com um decréscimo posterior na presença de doses excessivas de B (Rocha Filho, *et al.*, 1978).

A Figura 3, mostra a variação na massa seca de calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro.

Tabela 5. Variação na massa seca de calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

TRATAMENTOS (mM de boro)	MASSA SECA(g)
0	0,1107 a
25	0,1377 a
50	0,2743 b
100	0,0810 a
200	0,0827 a

Figura 3. Variação na massa seca de calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro.

5.3 Determinação de carboidratos não estruturais totais (Método de Antrona - Yemm e Willis, 1954)

5.3.1 Extração e preparo do reagente

A partir das leituras das amostras padrão de glicose obteve-se a curva analítica de calibração para quantificar o teor de proteínas totais em amostras de calos de *E. urophylla*, onde o valor de R^2 foi próximo a 1 (Figura 4). Os dados obtidos com as leituras das amostras do padrão foram registrados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de absorbância utilizados para preparo de curva analítica de calibração para glicose

CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE (mg. glicose.L ⁻¹)	VALORES DE ABSORBÂNCIA	
	REPETIÇÕES	
0	0	0
50	0,318	0,314
75	0,458	0,507
100	0,591	0,598
150	0,921	0,909
175	0,96	1,045
200	1,176	1,22

Figura 4. Curva analítica de calibração para glicose

5.3.2 Análise das amostras de carboidratos não estruturais totais

Os teores de açúcares totais não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos exceto para a concentração com 200mM de boro, no entanto observando os dados apresentados na Tabela 7, é possível verificar pequeno acréscimo nos valores de açúcares acumulados em resposta as concentrações de boro.

De acordo com os dados obtidos estatisticamente o boro interfere no metabolismo de açúcares apenas no tratamento com 200mM de B (Tabela 7 e Figura 5).

As moléculas de açúcares controlam uma grande quantidade de processos bioquímicos, sendo muito importantes ao metabolismo celular (Leningher, 1975). Variações no tipo ou teor de açúcares predominante em calos indicam uma maior probabilidade de ocorrência de processos embriogênicos (Kikuchi *et al.*, 1995, Yeo

et al., 1998, Magnaval *et al.*, 1997). Espera-se que calos com maiores concentrações de açúcares respondam mais favoravelmente a indução de um processo embriogênico.

No entanto neste ensaio, não foi possível observar embriões somáticos no tratamento com 200 mM. A maior capacidade de divisão celular em calos foi verificada no tratamento com 50 mM, indicando uma possível resposta embriogênica (Figura 17B).

Tabela 7. Conteúdo de açúcares totais em calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

TRATAMENTOS	AÇÚCARES TOTAIS
(mM de boro)	(mg)
0	6,912 b
25	7,418 b
50	7,3513 b
100	7,7773 b
200	11,744 a

Figura 5. Conteúdo de açúcares totais em calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

5.4 Quantificação de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

5.4.1 Preparo de reagentes e extração de proteínas totais

Os valores das leituras das amostras do padrão de albumina são apresentados na Tabela 8 e a Figura 6 mostra a curva analítica de calibração de albumina utilizada para a quantificação dos teores de proteínas totais em calos de *E. urophylla*. Os valores de R^2 foram próximos a 1.

Tabela 8. Valores de absorvância utilizados para preparo de curva analítica de calibração para albumina

CONCENTRAÇÕES DE ALBUMINA (mg.L ⁻¹)	VALORES DE ABSORBÂNCIA REPETIÇÕES	
0	0	0
10	0,038	0,027
20	0,365	0,365
40	0,494	0,49
60	0,579	0,586
80	0,66	0,664
100	0,715	0,742
120	0,963	0,905
140	0,92	0,968
160	0,91	1,074
180	1,013	1,115
200	1,079	1,168

Figura 6. Curva analítica de calibração para albumina

5.4.2 Análise das amostras de proteínas totais

Estatisticamente a produção de proteínas apresentou aumento significativo, mas houve um pequeno aumento na concentração para o tratamento com 50 mM de B. No entanto, observando os valores da Tabela 9, é possível notar um pequeno aumento das concentrações de proteínas até 50 mM de boro com posterior queda dos acúmulos nos tratamentos com doses tóxicas (100 e 200mM) o que poderia indicar a interferência do elemento na constituição destas unidades metabólicas.

Uma das principais funções do boro em organismos vegetais é a de elemento estrutural, sendo suas funções metabólicas extremamente discutidas, no entanto Parr e Longhman (1985), discutem que sob deficiência do elemento ocorre uma queda na síntese de RNA e conseqüentemente na síntese de proteínas. Desde forma os resultados obtidos concordam com as afirmações dos autores uma vez que níveis deficientes e tóxicos apresentaram maiores concentrações de proteínas.

Tabela 9. Conteúdo de proteínas totais em calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

TRATAMENTOS	PROTEÍNAS
(mM de boro)	(mg)
0	10,40 a
25	11,61 a
50	12,73 a
100	12,38 a
200	11,01 a

Figura 7. Conteúdo de proteínas totais em calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

5.5 Avaliação de prolina (Bates, 1973)

5.5.1 Extração e preparo dos reagentes

A curva analítica de calibração obtida para os padrões utilizados, apresentou valor de R^2 próximo de 1 o que possibilitou a subsequente análise das amostras de calos de *E. urophylla* (Figura 8). Os dados obtidos através das leituras em espectrofotômetro tiveram seus dados apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de absorbância utilizados para preparo de curva analítica de calibração para prolina

CONCENTRAÇÕES DE PROLINA (mg)	VALORES DE ABSORBÂNCIA REPETIÇÕES	
	0	0
0	0,038	0,027
10	0,365	0,365
20	0,494	0,49
40	0,579	0,586
60	0,66	0,664
80	0,715	0,742
100

Figura 8. Curva analítica de calibração para prolina

5.5.2 Análise das amostras de prolina

A figura 9 mostra a curva obtida para os teores de prolina em calos de *E. urophylla*. A través desta figura, podemos notar um aumento significativo deste aminoácido na dose de 100mM e 200mM de boro. A Tabela 11, mostra que os teores de prolina não apresentaram aumento significativo até o tratamento com 50mM de B.

Nos tratamentos com 100 e 200 mM de B houve um acúmulo duas vezes maior aos valores encontrados em outros tratamentos. Concentrações maiores de determinados metabólitos podem indicar condições de estresse causado pelas doses tóxicas de boro. Estas afirmações concordam com Aspinall e Paleg (1981), que afirmam que acúmulos de prolina são uma resposta de tecidos vegetais a fatores indutores do estresse, como salinidade, temperaturas baixas ou altas e déficit hídrico.

Tabela 11. Conteúdo de prolina em amostras de calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

TRATAMENTOS	PROLINA
(mM de boro)	(µg prolina/g massa fresca)
0	27,716 b
25	32,590 b
50	39,204 b
100	88,854 a
200	85,087 a

Figura 9. Conteúdo de prolina em amostras de calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

5.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para análise de proteínas totais

As bandas de proteínas totais obtidas com a eletroforese em gel de poliacrilamida são apresentadas na Figura 10, através da análise do gel não foi possível observar diferenças marcantes entre os tratamentos.

Proteínas de peso molecular variando de 20 a 40 kDa, podem estar relacionadas ao processo de embriogênese somática (Chen *et al.*, 1987; Kiyosue *et al.*, 1991). No entanto, de forma geral, não foram observadas variações entre as bandas de proteínas fato que sustenta os resultados obtidos com as quantificações de proteínas totais, onde não foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 5). Desta forma podemos supor que os níveis de B fornecidos não foram capazes de formar ou destruir proteínas.

Figura 10. Aspecto das bandas protéicas observadas em calos de *E. urophylla*

5.7 Extração de componentes da parede celular: Análise de pectinas (açúcares totais em paredes de calos de *E. urophylla* - Método fenol-sulfúrico-Dubois *et al.*, 1956)

5.7.1 Extração e preparo dos reagentes

A curva analítica de calibração obtida para os padrões utilizados é representada na Figura 11, onde R^2 apresentou valor próximo a 1, possibilitando a análise das amostras de paredes celulares de calos de *E. urophylla*. A Tabela 12, apresenta os valores das leituras das amostras do padrão utilizado.

Tabela 12. Valores de absorvância utilizados para preparo de curva analítica de calibração para glicose

CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE (mg)	VALORES DE ABSORBÂNCIA	
	REPETIÇÕES	
0	0	0
10	0,0182	0,206
20	0,370	0,479
30	0,587	0,597
40	0,913	0,908
50	0,918	0,920

Figura 11. Curva analítica de calibração para glicose

5.7.2 Análise das amostras de pectinas

Analisando a Figura 12, é possível observar que a porcentagem de pectinas na parede celular de calos não sofreu mudanças significativas com o aumento das doses de boro. O boro forma complexos na parede celular (complexo-boro pectinas) e quando o micronutriente está presente em doses deficientes a maior parte dele liga-se a frações de pectinas. No entanto, as doses de boro não interferem no conteúdo total de pectinas da parede. Estes dados confirmam os obtidos por Hu *et al.* (1996), que ao analisar 14 espécies vegetais observou que a quantidade de pectinas não era alterada pela deficiência de boro. Porém concentrações de pectinas da parede celular podem influenciar positivamente o conteúdo de boro ligado a parede (Brown e Hu, 1994).

Tabela 13. Conteúdo de pectinas em calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

TRATAMENTOS (mM de boro)	% DE PECTINA DA PAREDE CELULAR
0	6,50 a
25	6,70 a
50	6,82 a
100	6,90 a
200	7,10 a

Figura 12. Porcentagem de pectinas na parede celular de calos de *E. urophylla* cultivados sob diferentes concentrações de boro

5.8 Quantificação de ácido urônico (Fry *et al.*, 1988)

5.8.1 Extração e preparo dos reagentes

Foram realizadas análises em amostras padrão e estabelecida a curva padrão para ácido urônicos, de onde se obteve um valor satisfatório para o R^2 , o que permitiu o prosseguimento da análise das amostras (Figura 13).

Tabela 14. Conteúdo de ácido urônico em calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

TRATAMENTOS (mM de boro)	% DE ÁCIDO URÔNICO DA PAREDE CELULAR
0	1,51 a
25	1,53 a
50	1,56 a
100	1,57 a
200	1,6 a

Figura 13. Curva padrão para ácido urônico

5.8.2 Análise das amostras

A concentração de ácido urônico presente em calos de *E. urophylla* não apresentou diferenças significativa entre os tratamentos, mostrando que as doses de boro não interferem na porcentagem de ácido urônico da parede. Estes dados

assemelham-se com os obtidos através da análise de pectinas (Figura 12), que também não sofreram mudanças significativas a medida que doses de boro foram implementadas. Hu *et al.* (1996), apresentaram dados semelhantes em outras espécies vegetais confirmando os resultados de que teores de boro não interferem nas quantidades de ácido urônico e conseqüentemente nos teores de pectinas

Tabela 15. Conteúdo de ácido urônico em calos de *E. urophylla* cultivados em meio N7 com variação nas concentrações de boro

TRATAMENTOS (mM de boro)	% DE ÁCIDO URÔNICO DA PAREDE CELULAR
0	1,51 a
25	1,53 a
50	1,56 a
100	1,57 a
200	1,60 a

Figura 14. Concentração de ácido urônico em calos de *E. Urophylla*

5.9 Estudos organográficos e anatômicos de calos de *E.urophylla* cultivados sob diferentes concentrações de boro.

Os aspectos morfológicos externos dos calos estão representados nas Figuras 15 e 16 (A-E) e as Figuras 17 (A-D), mostram os caracteres histológicos.

Na Figura 15, é possível observar as diferenças obtidas entre os tratamentos. Nota-se claramente diferenças na cor, tamanho, presença ou não de raízes e presença ou ausência de antocianina para cada um dos ensaios (Tabela 16).

A avaliação visual, baseada em sintomas morfológicos externos é um dos procedimentos mais utilizados para diagnosticar anomalias minerais, principalmente em plantas deficientes em B. No entanto, a manifestação de sintomas visuais externos relacionam-se a modificações ao nível celular.

Figura 15. Morfologia externa de calos de *E.urophylla* cultivados em N7 com diferentes concentrações de boro.

Tabela 16. Análises morfológicas em calos de *E. urophylla* cultivados em diferentes concentrações de boro realizadas durante o 21º dia de cultivo

TRATAMENTOS (mM DE BORO)	COLORAÇÃO DOS SEGMENTOS	MORFOLOGIA EXTERNA
0	MARROM	Tamanho menores Calos não friáveis, apresentando aspecto gel mole, ausência total de estruturas globulares na superfície do calo Ausência total de raízes
25	AMARELO TENDENDO A MARROM	Tamanho próximo ao T0, presença de estruturas globulares na superfície. Calos com baixa friabilidade Pequena presença de raízes
50	AMARELO	Maiores tamanho Presença marcante de antocianinas Muito friáveis, com presença de estruturas globulares distintas na superfície do calo Presença pequena de raízes
100	AMARELO COM PONTOS MARRONS	Tamanho inferior a T50 Pouca presença de antocianina Calos regularmente friáveis, mas com presença de estruturas globulares na superfície do calo Presença pequena de raízes
200	MARROM	Tamanho menor Calos pouco friáveis, com estruturas globulares pouco evidentes. Presença de muitas raízes em toda a extensão do calo

No tratamento com 0 mM de B (Figura 16 A), verifica-se uma ausência de friabilidade no calo, sendo que este apresenta aspecto gel. Aparentemente o processo de diferenciação não foi atingido, sugerindo uma provável interferência do boro nestes processos celulares. Avaliações histológicas deste calo mostrou um

colapso celular (Figura 17 A), o que pode confirmar a desestruturação da parede celular reafirmando o papel estrutural do B. Estes dados são confirmados pelas observações de Van Duin *et al.* (1987), que afirma que o ácido bórico presente na parede celular forma complexos que contribuem para a manutenção das propriedades físicas das células. Findekleee e Goldbach (1996), verificaram também que o micronutriente está associado a deposição ordenada de material péctico no crescimento da parede primária.

É possíveis observar índice maior de oxidação em calos cultivados com doses insuficientes (Figura 16 A e B, 0 e 25 mM de B, respectivamente) e excessiva de boro (200 mM, Figura D). O desbalanço nutricional causado pela ausência ou toxidez de B pode causar aumento de fenóis e atividade enzimática desordenada. Estas hipóteses concordam com Cakmak *et al.* (1995), que afirmou que em muitos casos a deficiência de B associa-se ao escurecimento de tecidos foliares, sendo este escurecimento uma consequência provável do aumento do acúmulo de fenóis e da atividade da polifenol-oxidase (PPO). As quinonas produzidas pela PPO são polimerizadas e geram pigmentos marrons. O acúmulo de quantidades substanciais de quinonas em espécies de plantas sensíveis a deficiência de B tem sido considerada como a maior causa de danos celulares e suspensão do crescimento (Lee e Aronoff, 1967).

Na Figura 16C (50 mM de B), é evidente a formação de calos friáveis com síntese de antocianinas na maior parte da superfície. O calo apresentou duas regiões distintas: uma com características organogênicas e sem acúmulo de antocianinas e outra com características embriogênicas e com grande quantidade de antocianinas. Cortes histológicos apresentados na Figura 17 B (50 mM de B), mostrou a formação de centros meristemáticos em divisão com nucléolos proeminentes o que provavelmente resultaria na formação de estruturas embriogênicas.

Analisando a Figura 17 C (50 mM de B), pode-se verificar a ocorrência da formação de centros meristemáticos a partir da epiderme caracterizando estruturas embriogênicas com fortes evidências para a formação de futuros embriões. De

acordo com Micahux-Ferrière *et al.*(1992), a embriogênese somática pode estar relacionada com a formação de “clusters” meristemáticos, caracterizados por células isodiamétricas, nucléolo proeminente indicando alta síntese protéica. Segundo estes autores, estas estruturas evoluem para unidades embriogênicas e originam pró-embriões globulares.

Os calos cultivados em doses tóxicas de boro apresentaram um grande número de raízes, como pode ser verificado na Figura 16 E (200 mM de B). Outros tratamentos também proporcionaram a formação de estruturas radiculares (Figuras 16 B, C e D, 25, 50 e 100 mM de B respectivamente), porém em quantidades inferiores. No tratamento com dose de 25 mM de B (Figura 16 B), foi possível visualizar grande quantidade de estruturas globulares na superfície do calo, que a análise anatômica comprovou serem raízes (Figura 17D).

Na Figura 16 E, foi possível observar que doses tóxicas de B (200 mM) promoveram a proliferação exagerada de raízes em calos.

Verifica-se na literatura que plantas deficientes em B apresentam decréscimo na concentração de ácido ascórbico em pontas de raízes de abóbora, este fato pode ser atribuído a participação do boro na biossíntese deste ácido (Lukaszewski e Blevins, 1996).

Desta forma poderíamos supor que altas concentrações do micronutriente estimulam a produção do ácido ascórbico aumentando portanto a produção de raízes.

Figura 16. (A-E). Aspectos morfológicos externos de calos de *E. urophylla* aos 21 dias de cultivo . (A) Calos com 0 mM de boro apresentando ausência de diferenciação e aspecto gel. Bar=870 μm . (B), calos com 25 mM de B apresentando estruturas globulares na superfície. Bar=810 μm ; (C), calos com 50 mM de B apresentando região com antocianinas (seta) e grande friabilidade. Bar=810 μm ; (D), calos com 100 mM de B, apresentando aspecto menos friável. Bar=590 μm ; (E), calos cultivados com 200 mM de B apresentando grande quantidade de raízes. Bar=590 μm .

Figura 17 Aspectos anatômicos de calos de *E. urophylla* aos 21 dias de cultivo. (A), secção longitudinal do calo mostrando células colapsadas (seta). Bar= 199 μ m. (B) Centros meristemáticos com intensa divisão celular e nucléolos proeminentes (seta). Bar= 37 μ m. (C) Centros meristemáticos crescidos a partir da epiderme de calos (seta). Bar= 37 μ m. (D) Formação de estruturas radiculares em calos. Bar= 199 μ m

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos objetivos propostos e nas hipóteses estabelecidas, foi possível verificar que:

- ✓ O boro interferiu na quantidade de massas fresca e seca dos calos cultivados em diferentes concentrações, sendo que no tratamento com 50mM ocorreu os maiores valores de massas.
- ✓ Carboidratos não estruturais sofreram interferência significativa dos teores de boro apenas em doses tóxicas.
- ✓ Proteínas totais não sofreram mudanças significativas com o aumento das doses de B.
- ✓ Os teores de prolina apresentaram elevados valores nos tratamentos com 100 e 200 mM de B, indicando que nestas doses há um maior índice de estresse.
- ✓ Pectinas e ácido urônico não apresentaram diferenças significativas em relação as doses de boro, mostrando que as concentrações do elemento não influenciam a formação destes componentes da parede celular.
- ✓ As análises anatômicas evidenciaram que a ausência de boro provocou o colapso e desagregação celular. As doses padrão (50 mM de B), foram as que apresentaram as melhores respostas na indução e provável formação de estruturas embriogênicas
- ✓ Doses tóxicas de boro (200 mM) causam a formação acentuada e desordenada de estruturas radiculares.

7 CONCLUSÃO

As análises bioquímicas para as concentrações crescentes de B mostraram relação estatística pouco expressiva, no entanto através de dados organográficos e anatômicos as interferências destas concentrações foram evidenciadas e comprovadas. Com base nestes resultados pode-se verificar a importância do boro como agente estrutural e morfogenético sendo menos participante de processos metabólicos celulares.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. Emprego da cultura *in vitro* para a multiplicação vegetativa de pupunha (*Bactris gasipaes* H.b.K.) Palmae. São Paulo, 1994. 79 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.; YAMADA, Y. (Ed.) **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1983.
- ARLAND, T.H.Jr; EL-BAHTIMY, K.; FISHMAN, M.L. Analysis of pectin structure by HPAE-PAD. In: LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.F. (Ed.) **Plant cell wall analysis**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. p. 129 - 146 (Modern Methods of Plant Analysis, 17)
- ARRUDA, S.C.C. Efeito do cálcio na indução de embriogênese somática de *Eucalyptus urophylla*. Piracicaba, 2000. 74 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ASPINAL, D.; PALEG, L.G. Proline accumulation physiological aspects. In: PALEG, L.G.; ASPINAL, D. **The physiological and biochemistry of drought resistance in plants**. New York: Academic Press, 1981. p. 205-259.
- BAR-AKIVA, A. Functional aspects of mineral nutrients in use for the evaluation of plant nutrition requirement. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON PLANT ANALYSES AND FERTILIZER PROBLEMS, 6., 1971. **Recent advances in plant nutrition: proceedings**. 1971. v.1, p.115-142.

BARRICHELO, L.E.G; BRITO, J.C. A madeira das espécies de eucalipto como matéria-prima para a indústria de celulose e papel. **PRODEPEP**, Série divulgação, n.3. 145p.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P. E TEARE, I. D. (). Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, 39, 205-207 p. 1973

BELLOTE, A. F. J.. Concentração, acumulação e exportação de nutrientes pelo *Eucalyptus grandis* (Hill ex- Maiden) em função da idade. Piracicaba, 1979. 129p. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo.

BONNILA, I.; VILLASEÑOR, C.M.; CAMPOS, M.A.; SÁNCHEZ, N.; PÉREZ; LÓPEZ, L.; CASTREJÓN, L.; SÁNCHEZ, F.; CASSB, G.I. The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxyproline-proline rich proteins. **Plant Physiology**, v.115, p.1329-1340, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254 , 1976.

BRETT C., WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 255p.

BROWN, P.H.; HU, H. Boron uptake by sunflower, squash and culture tobacco cells. **Physiologia Plantarum**, v.91, p.435-441, 1994

- BROWN, P.H.; HU, H. Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species. **Annals of Botany**, v.77, p.497-505, 1996.
- BUCKLEY, G.P. Soil factors influencing yields of *Eucalyptus camaldulensis* on Former tin-mining land in the Jos plateau region, Nigeria. **Forest Ecology and Management**, v.23, n.1, p.1-17, 1990.
- CAKMAK, I., KURZ, H.; MARSCHNER, H. Short-term effects of boron germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. **Physiologia Plantarum**, v.59, p.11-18, 1995.
- CHEN, L.J.; LUTHE, D.S. Analysis of proteins from embryogenic and nonembryogenic rice (*Oryza sativa*) calli. **Plant Science**, v.48, p.1981-1988, 1987.
- CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience**, v.23, p.515-519, 1988.
- DARVILL, A.; McNEIL, M.; ALBERSHEIM, P.; DELMER, D.P. The primary cell wall of flowering plants. In: TOLBERT, N.E. (Ed.) **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, 1980. p. 91-161.
- DE VRIES, J.A.; ROMBOUTS, F.M.; VORAGEN, A.G.J.; PILNIK, W. Enzymatic degradation of apple pectins. **Carbohydrate Polymer**, v.2, p.25-33, 1982.
- DE VRIES, S.C.; BOOIJ, H.; JANSEENS, R.; RONALD, V.; SARIS, L.; LO SCHIAVO, F.; TERZI, M.; VAN KAMMEN, A. Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. **Genes Development**, v.2, p.462-476, 1988.

- DELL, B. Diagnosis of nutrient deficiencies in eucalypts. In: ATTIWILL, P.M.; ADAMS M.A (Ed.) **Nutrition of eucalypts**. Australia: CSIRO, 1996. p.417 - 440.
- DIAS, A.C. Reabilitação de áreas mineradas de bauxita. **Silvicultura**, n 8, v.28, p.39-42, 1982.
- DUBOIS, M. GILLES, A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-355, 1956.
- FINDEKLEE, P. GOLDBACH, H.E. Rapid effects of boron deficiency on cell wall elasticity modulus in *Curcubita pepo* roots. **Botanica Acta**, v.109, p.463-465, 1996.
- FOSKET, D.E. Characteristics of plant cells that are important in development. In: ??????. **Plant growth and development: a molecular approach**. New York: Academic Press, 1994. p.???-????.
- FRY, S.C. **The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis**. New York: Longman, 1988.333p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, CNPH, 1998. v.1, p.183-260.
- GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo culture of *Euterpe edulis* Mart. (palmae). **Plant Cell Reports**, v.7, p.550-552 , 1988.
- GUERRA, M.P; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., (Ed.)

Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, CNPH, 1999. v.2, p.533-568.

HIGASHI, E.N. Diagnose da deficiência de nutrientes minerais em três híbridos de *Eucalyptus* spp. Cultivados *in vitro*. Piracicaba, 1996. 90p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

HIGASHI, K.; KAMADA, H.; HARADA, H. The effects of reduced nitrogenous compounds suggests that synthetase activity is involved in the development of somtic embryos in carrot. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.109-114, 1997.

HU, H.; BROWN, P. H. Absortion of boron by plant roots. **Plant and Soil**, v.193, p. 49-58, 1997.

HU, H.; BROWN, P. H. Localization of boron in cell walls of suash and tobacco and its association with pectin. **Plant Physiology**, v.105, p.681-689, 1994.

HU, H.; BROWN, P.H.; LABAVITCH., J.M. Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.227-232, 1996.

ISHII, T.; MATSUNAGA, T. Isolation e caracterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. **Carbohydr Research**, v.284, p.1-9, 1996.

JARVIS, M.C. Structure and properties of pectin gels in plant cell wall. **Plant Cell Environment**, v.7, p.153-164, 1984.

JONES JR., J.B; WOLF, B.; MILLS, H.A. **Plant analysis handbook: a practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide.** Athens: Micro-Macro Publ., 1991. p.127-189.

- KARNOVSKI, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137-138, 1965.
- KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, CNPH, 1999. v.2, p.519-532.
- KIKUCHI, A; SATOH, S.; NAKAMURA, N; FUJI, T. Differences in pectic polyssaccharides between carrot embryogenic and non embryogenic calli. **Plant Cell Reports**, v.14, p.279-284, 1995.
- KIYOSUE, T.; SATOH, S.; KAMADA, K.; HARADA, H. Purification and immuno histochemical detection of the embryogenic cell protein in carrot. **Plant Physiology**, v.95, p.1077-1083, 1991.
- KOBAYASHI, M.; MATOH, T.; AZUMA, J-I. Two-chain of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. **Plant Physiology**, v.110, p.1017-1020, 1996.
- KOMAMINE, A.; MATSUMOTO, M.; TSUKAHARA, M.; FUJIWARA, A.; KAWAHARA, R.; ITO, M.; SMITH, J.; NOMURA, K., FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures-physiology, biochemistry and molecular biology. In: NIJKAMP, H.J.J.; VAN DER PLAS, L.H.W.; VAN AARTRIJK, J. (Ed.) **Progress in plant cellular and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1990. p.307-313.
- LEE, S.G.; ARONOFF, S. Investigations on the role of boron in plants. III. Anatomical observations. **Plant Physiology**, v.41, p.1570-1577, 1966.
- LENINGHER, A.L. **Biochemistry: the molecular basis of cell structure and function**. New York: Worth Publ., 1975. 1104p.

- LEWIS, D.H. boron, lignification and origin of vascular plants-a unified hypothesis. **New Phytologist**, v. 84, p.209-229, 1980.
- LIMA, W.P. Overland flow and soil and nutrient losses from eucalyptus plantations. **IPEF International**, v.1, p.35-44, 1990.
- LOOMIS, W.D.; DURST, R.W. Chemistry and biology of boron. **Biofactors**, v.3, p.229-239, 1992.
- LOVATT, C.J. Evolution of xilem resulted in a requirement for boron in the apical meristems of vascular plants. **New Phytologist**, v.99, p.509-522, 1985.
- LUKASZEWSKI, K.M.; BLEVINS, D.G. Root growth inhibition in boron-deficient or aluminum-stressed squash plants may be a result of impaired ascorbate metabolism. **Plant Physiology**, v.112, p.1-6, 1996.
- LUKASZEWSKI, K.M.; BLEVINS, D.G., RANDALL D.D. Asparagine and boric acid cause allantoate accumulation in soybean leaves by inhibiting manganese-dependent allantoate amidohydrolase. **Plant Physiology**, v.99, p.1670-1676, 1992.
- MAGNAVAL, C.; NOIROT, M.; VERDEIL, J.L.; BLATTES, A.; HUET, C. GROSDEMANGE, F.; BEULÉ, T.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutritional requirements of coconut calli (*Cocos nucifera* L.) during somatic embryogenesis induction. **Journal of Plant Physiology**, v.150, p.719-728, 1997.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980. 251p.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995. 674p.
- MATOH , T.; ISHIGAKI, K-I; MIZUTANI, M.; MATSUNAGA; TAKABE, K. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. I. Requirement for intracellular

- localization of boron and selection of cells that tolerate low levels of boron. **Plant Cell Physiology**, v.33, p.1135-1141, 1992.
- MATOH, T. Boron in plant cell walls. **Plant and Soil**, v.193, p.59-70, 1997.
- MATOH, T.; ISHIGAKI, K-I.; KAORI, O.; AZUMA, J-I. Isolation and characterization of a boron-polyssaccharide complex from radish roots. **Plant Cell Physiology**, v.34, p.639-642, 1993.
- MATOH, T.; SAYAKA, K.; KOBAYASHI, M. Ubiquity of borate-rhamnogalacturonan II complex in the cell walls of higher plants. **Plant Cell Physiology**, v.37, n.5, p.636-640, 1996.
- MAZEAU, K.; PÉREZ, S. The preferred conformations of the four oligomeric fragments of Rhamnogalacturonans II. **Carbohydrate Research**, v.311, p.203-217, 1998.
- McNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v.53, p.652-683, 1984.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. Bern: International Potash Institute, 1987. 655p.
- MICHAUX - FERRIÈRE, N.; GROUT, H.; CARRON, M.P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v.79, n.2, p.174-180, 1992.
- NABLE, R.O.; BANUELOS, G.S.; PAULL, J.G. Boron toxicity. **Plant and Soil**, v.193, p.181-198, 1997.

- NGUYEN M.N.; LUKASZEWSKI, K.M.; BLEVINS, D.G. IAA oxidase activity in squash roots may be regulated by boron and manganese interaction. **Plant Physiology**, v.102, n.7, 1995.
- PARR, A.J.; LOUGHMAN, B.C. Boron and membrane function in plants. In: ROBB, D.A.; PIERPOINT, W.S. **Metal and micronutrients: uptake and utilization by plants**. New York: Academic Press, 1983. p.87-107.
- PARROT, W.A.; DURHAM, R.E.; BAILEY, M.A. Somatic embryogenesis in legumes. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry-31-somatic embryogenesis and synthetic seed II**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.200-207.
- PARROT, W.A.; MERKLE, S.A.; WILLIAMS, E.G. Somatic Embryogenesis: potencial for use in propagation and gene transfer systems. In: MURRAY, D.R. (Ed.) **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Wallingford: CAB International, 1991. p.158-200.
- PILBEAN, D.J.; KIRKBY, E.A. The physiological role of boron in plants. **Journal of Plant Nutrition**, v.6, n.7, p.563-582, 1983.
- PRASSAD, R. Sal plantation on bauxite mined out site of Madhya Pradesh. **Journal of tropical Forestry**, v.4, p.68-73, 1988.
- PRASSAD, R. Performance of eucalyptus on the Wastelands of Madhya Pradesh. **Journal of Tropical Forestry**, v.3, p.311-317, 1987.
- PRYOR, L.D. Biology of *Eucalyptus*. The institut of biology. **Studies in biology**. London: Edward Arnold., 1976. 82p.
- REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle na geweberkulturn aus karotten. **Naturwissenschaften**, v.45, p.344-345, 1958.

- ROCHA FILHO, J.V.C.; HAAG, H.P.; OLIVEIRA, G.D. Deficiência de macronutrientes, boro e ferro em *Eucalyptus urophylla*. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz"**, v.?, n?, p.?, 1978.
- SAKAI, W.S. Simple method for diferencial staining of parafilm embedded plant material using toluidine blue 01. **Stain Technology**, v.48, p.247-249, 1973.
- SCHUMANN, G.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J.; KLOCKE, E. Anatomy of somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Somatic embryogenesis and synthetic seed I**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 3-19.
- SHARMA, P.N.; RAMVHANDRA, T. Water relations and photosynthesis in mustard plants subject to boron deficiency. **Indian Journal of Physiology**, v.33, n.2, p. 150-154, 1990.
- SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; SONDAHL, M. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: FUJIWARA, A. (Ed.) **Plant tissue culture**. Tokyo: Maruzen, 1982. p.759-762.
- SHELP, B.J. Boron mobility and nutrition in broccoli (*Brassica oleraceae* var. *italica*). **Annals of Botany**, v.61, p.83-91, 1993.
- SILVEIRA, R. L.V. DE A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; MOREIRA, A. Avaliação do estado nutricional do *Eucalyptus*: Diagnose visual, foliar e suas interpretações. In: GONÇALVES, J.L.DE M.; BENEDETTI, V. (Ed.) **Nutrição e fertilização florestal**. Piracaba: IPEF, 2000. 427p.
- SIMOLA, L.K. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula* f. *purpurea*. **Scientia Horticulturae**, v.26, p.77-85, 1985.
- SKOK, J. The substitution of complexing substances for boron in plant growth. **Plant Physiology**, v.32, p.308-312, 1957.

- SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A. Citrus. In: AMMIRATO, P; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (Ed.) **Handbook of plant cell culture: crop science**. New York: MacMillan, 1984. v.3, p.355-372.
- SPURR, A. R. The effect of boron on cell walls structure in celery. **American Journal of Botany**, v.44, p.637-650, 1957.
- STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v.45, p.705-708, 1958.
- TEASDALE, R.D.; RICHARDS, D.K. Boron deficiency in cultured ine cells. Quantitatives studies of interaction with Ca and Mg. **Plant Physiology**, v.93, p.1071-1077, 1990.
- THORPE, T. A. Morphogenesis and regeneration in tissue culture. In: **Genetic engeneering: applications to agriculture**. 1983. p. 285-302.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, CNPH, 1998. v.1.
- VAN DER LINDER, P.C.G. Hormone action and sensitivity: possible relation to aging. In: RODRIGUES, R.; SANCHES, M.; TAMES, R.; DURZAN, D.J. (Ed.) **Plant aging: basic and applied approaches**. New York: Plenun Press, 1990. p.285-292.
- VAN DUIN, M.; PETERS, J.A.; KIEBOMM, A.P.G.; VANBEKKUM, H. Synergic coordination of calcium in borate-polyhydroxycarboxylate systems. **Carbohydrate Research**, v.162, p.65-78, 1987.

- WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cell as na embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462,1986.
- YAMAUCHI T.; HARA, T.; SONODA, Y. Distribution of calcium and boron in the pectin fraction of tomato leaf cell wall. **Plant Cell Physiology**, v.27, p.729-732, 1986
- YAMAUCHI, M. The role of B in higher plants: relationship between B and Ca on the pectin substances in plants. **Journal Science Soil Natural.**, v.42, p.207-213, 1971.
- YEMM E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v.57, p.508-515, 1954.
- YEO, U. D.; KOHMURA, H.; NAKAGAWA, N.; SAKURAI, N. Quantitative and qualitative changes of cell wall polysaccharides during somatic embryogenesis and plantet development of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) **Plant Cell Physiology**, v.39, n.6, p.607-614, 1998.
- YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORP, T.A., (Ed.) ***In vitro* embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.205-247.
- ZIMMERMANN, J.L. Somatic Embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v. 5, p.1411-1423, 1993.