Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Bioquímica do estresse, histoquímica e aspectos ultraestruturais de calos de teca
(*Tectona grandis* L.f.) visando a indução da embriogênese somática

Renato da Silva Barbosa

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Recursos Florestais.
Opção: Silvicultura e Manejo Florestal

Piracicaba
2019

Renato da Silva Barbosa
Engenheiro Florestal

Bioquímica do estresse, histoquímica e aspectos ultraestruturais de calos de teca
(*Tectona grandis* L.f.) visando a indução da embriogênese somática
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ANTÔNIO NATAL GONÇALVES**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Recursos Florestais.
Opção em Silvicultura e Manejo Florestal

Piracicaba
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Barbosa, Renato da Silva

Bioquímica do estresse, histoquímica e aspectos ultraestruturais de calos de teca (*Tectona grandis* L.f.) durante a indução da embriogênese somática / Renato da Silva Barbosa. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

65 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cultura de tecidos 2. Embriões 3. Microscopia 4. Enzimas I. Título

DEDICATÓRIA

A Deus, quem me fez fonte de luz, sempre me abençoando e guiando, Dedico.

A minha família, a qual sempre foi meu pilar principal, meu pai Hélio, minha mãe Maria Helena e meu irmão Fernando, Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder o dom da vida, me guiando e me regendo sempre por belos caminhos

Aos meus dois orientadores, Prof. Dr. Marcílio de Almeida e Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves, os quais me ensinaram como ser alguém melhor tanto profissionalmente quanto pessoalmente.

À agência CAPES, pela bolsa de doutorado fornecida ao longo dos quase quatro anos de curso.

Aos meu tão queridos amigos de infância, bem como aqueles novos conquistados, desejo a vocês tudo de melhor que a vida tenha a oferecer.

À secretária do Programa de Recursos Florestais da ESALQ/USP, Giovana Oliveira, pela qualidade do trabalho prestado.

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica (NAP/MEPA), em nome do meu xará, Renato.

À Maria, técnica do laboratório do professor Tomazello, obrigado pela disponibilidade e pelo carinho.

Ao Ênio e a Fátima, que desde a época da graduação sempre me garantiram bons ensinamentos junto ao laboratório da Prof. Dra. Helaine Carrer.

À professora Cláudia do departamento de Genética, que mesmo morando no exterior soube me amparar.

À Salete, do laboratório Genética Bioquímica de Plantas, obrigado pelos ensinamentos, pelo tempo dedicado e pelos puxões de orelha.

Também tem espaço para agradecer a todos aqueles que participaram dessa fase mesmo fora do meu cotidiano acadêmico.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ao Departamento de Ciências Florestais, e ao Programa de Pós Graduação em Recursos Florestais pela oportunidade e por fazer de mim um grande profissional.

EPÍGRAFE

“A mais bela coisa que podemos vivenciar é o mistério.
Ele é fonte de qualquer arte verdadeira e qualquer ciência.
Aquele que desconhece esta emoção,
aquele que não pára mais para pensar e não se fascina, está como morto:
seus olhos estão fechados”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 OBJETIVO GERAL	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. <i>TECTONA GRANDIS</i> L.F.	15
2.2. REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL	16
2.3. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	18
2.4. ANÁLISES HISTOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL	18
2.5. BIOQUÍMICA DO ESTRESSE	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	23
3.2. MATERIAL VEGETAL	23
3.3. DESINFESTAÇÃO	23
3.4. INDUÇÃO DE CALOS	24
3.5. SELEÇÃO DE MATERIAL RESPONSIVO	26
3.5.1. Avaliação da frequência e cobertura de explantes por calos	26
3.5.2. Avaliação visual da oxidação	26
3.5.3. Análise histoquímica	27
3.6. REINTRODUÇÃO	27
3.7. ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	28
3.7.1. Coleta de material.....	28
3.7.2. Preparo do material	28
3.7.3. Análise de Microscopia eletrônica de varredura	28
3.8. ANÁLISE BIOQUÍMICA	28
3.8.1. Coleta do material	28
3.8.2. Extração enzimática	29
3.8.3. Determinação de proteínas	29
3.8.4. Atividade da catalase - CAT	29
3.8.5. Atividade da ascorbato peroxidase - APX.....	29
3.8.6. Atividade da superóxido dismutase - SOD	30
3.8.7. Peroxidação lipídica	30
3.8.8. Quantificação de peróxido de hidrogênio.....	31
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	31
3.10. RESUMO DA METODOLOGIA	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. TESTE DE INDUÇÃO DE CALOS	33
4.1.1. Frequência de calos	33
4.1.2. Cobertura por calos	34
4.1.3. Oxidação	37
4.1.4. Análise morfológica e histoquímica	39
4.2. ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	42
4.3. ANÁLISE BIOQUÍMICA	45
4.3.1. Determinação de proteínas	45
4.3.2. Atividade da Catalase (CAT)	46
4.3.3. Atividade da Ascorbato peroxidase (APX)	47
4.3.4. Atividade da Superóxido dismutase - SOD.....	47
4.3.5. Peroxidação lipídica	48
4.3.6. Quantificação de peróxido de hidrogênio.....	49

5. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	53

RESUMO

Bioquímica do estresse, histoquímica e aspectos ultraestruturais de calos de teca (*Tectona grandis* L.f.) visando a indução da embriogênese somática

A teca, *Tectona grandis* L.f., é uma espécie arbórea originária do sudeste asiático. Com o surgimento de políticas públicas nos países de origem, bem como a deficiência em tecnologia dos tratos silviculturais, a espécie passou a ser disseminada pelo mundo, principalmente nas Américas central e do sul. O principal destino do produto final dos plantios de teca é o mercado de móveis de luxo e embarcação naval. As características da sua madeira possibilita sua inserção neste mercado, bem como proporciona um alto valor de venda. Com o mercado em constante ascensão vê-se a necessidade de uma produção de madeira com alto valor agregado. A melhor opção para manter a produção de qualidade é o uso dos plantios clonais. Para tanto, ainda existem algumas falhas nos programas clonais de teca, sendo a principal delas a clonagem de matrizes com características ótimas para o mercado. Para alcançar o sucesso no processo de clonagem de espécies lenhosas tem-se utilizado das ferramentas biotecnológicas, como a cultura de tecido. A cultura de tecidos possibilita a morfogênese vegetal a partir de tecidos vegetais somáticos. A embriogênese somática é uma técnica em desenvolvimento para as espécies lenhosas, e tem contribuído para os programas clonais através da produção em larga escala de plântulas, bem como sementes sintéticas. A embriogênese somática em teca ainda tem sido estudada, e apresenta como suas principais barreiras a escolha do explante a ser introduzido *in vitro* e a oxidação durante a cultura de tecidos. Diante disso, o presente trabalho objetivou estudar a bioquímica do estresse, os aspectos ultraestruturais e histoquímica de calos de teca provenientes de explantes foliares, visando propor possíveis melhorias nas técnicas de cultivo *in vitro* para se obter sucesso na produção de embriões somáticos. O material vegetal utilizado foram explantes foliares coletados de matrizes de teca envasadas em viveiro. O material passou por desinfestação e foi introduzido em 16 diferentes tratamentos com diferentes balanços de 2,4-D e BAP. Através de análises morfológicas visuais e teste histoquímico com Carmim acético foram selecionados o melhor e pior tratamento para produção de calos embriogênicos. Foram selecionados T08, 0,5mgL⁻¹ de 2,4-D e 2,0mgL⁻¹ de BAP, como melhor resultado para produção de calos embriogênicos, e T06, 0,5mgL⁻¹ de 2,4-D e 0,1mgL⁻¹ de BAP, como calos não embriogênicos. Os calos provenientes dos dois tratamentos foram analisados quanto sua ultraestrutura, através da microscopia eletrônica de varredura, e também avaliados bioquimicamente, sendo avaliados: quantificação de proteínas, peróxido de hidrogênio, MDA, e atividade das enzimas CAT, APX e SOD. Os resultados possibilitaram confirmar a produção de estruturas pró-embriogênicas no tratamento T08 através da MEV. E a análise bioquímica evidenciou a enzima SOD como um possível marcador de resposta morfogênica. Além disso, as análises de estresse oxidativo permitiram verificar a qualidade das plantas matrizes, bem como inferir o estímulo do MDA e do peróxido de oxigênio como estimulantes a indução de embriões somáticos em calos de teca quando em baixas concentrações. Os resultados ainda possibilitaram identificar possíveis alterações no protocolo de indução da embriogênese em explantes foliares de teca.

Palavras-chave: Cultura de tecidos; Embriões; Microscopia; Enzimas

ABSTRACT

Biochemistry of stress, histochemistry and ultra-structural aspects of teak (*Tectona grandis* L.f.) calli for the induction of somatic embryogenesis

Teak, *Tectona grandis* L.f., is a tree species originating in Southeast Asia. With the emergence of public policies in the countries of origin, as well as the technology deficiency of silvicultural treatments, the species began to be disseminated throughout the world, mainly in central and southern America. The main destination for the final product of teak plantations is the market for luxury furniture and naval vessels. The characteristics of its wood enable its insertion in this market, as well as provides a high value of sale. With the ever-rising market, we see the need for a high value-added wood production. The best option to maintain quality production is the use of clonal plantations. In addition, there are still some flaws in teak clonal programs, the main one being the cloning of matrices with optimal characteristics for the market. To achieve success in the process of cloning woody species has been used of biotechnological tools, such as tissue culture. Tissue culture enables plant morphogenesis from somatic plant tissues. Somatic embryogenesis is a developing technique for woody species and has contributed to clonal programs through the large-scale production of seedlings as well as synthetic seeds. Somatic embryogenesis in teak has been studied, and presents as its main barriers the choice of explant to be introduced in vitro and oxidation during tissue culture. The aim of this study was to study stress biochemistry, ultrastructural aspects and histochemistry of teak calli from leaf explants, aiming at proposing possible improvements in in vitro culture techniques to be successful in the production of somatic embryos. The plant material used was foliar explants collected from nursery potted teak matrices. The material underwent disinfestation and was introduced in 16 different treatments with different 2,4-D and BAP balances. The best and worst treatment for embryogenic callus production was selected through visual morphological analysis and histochemical test with Acetic Carmim. T08, 0.5mgL⁻¹ of 2,4-D and 2,0mgL⁻¹ of BAP were selected as the best result for the production of embryogenic callus, and T06, 0.5mgL⁻¹ of 2,4-D and 0, 1mgL⁻¹ of BAP, as non-embryogenic callus. The calluses from the two treatments were analyzed by ultrasound using scanning electron microscopy and biochemically evaluated. Protein quantification, hydrogen peroxide, MDA, and CAT, APX and SOD enzymes were evaluated. The results allowed to confirm the production of pro-embryogenic structures in the T08 treatment through SEM. And the biochemical analysis evidenced the SOD enzyme as a possible marker of morphogenic response. In addition, the oxidative stress analyzes allowed to verify the quality of the matrix plants, as well as to infer the stimulus of the MDA and the oxygen peroxide as stimulants the induction of somatic embryos in the callus when in low concentrations. The results allowed to identify possible alterations in the protocol of induction of embryogenesis in leaf explants of teak.

Keywords: Tissue culture; Embryos; Microscopy; Enzymes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Explante da nervura principal de folha de teca proveniente do terço mediano da folha indicada na imagem "C" pela seta amarela.	23
Figura 2. Em azul estão destacadas as seções descartadas do material após o processo de assepsia ao lado esquerdo da imagem. Na imagem da direita explantes foliares inoculados em meio de cultura para indução de calos embriogênicos.....	24
Figura 3. Avaliação do parâmetro "cobertura por calos" onde a nota 1 representa 0% de cobertura do explante por calo, nota 2 representa 25% de cobertura do explante por calos, nota 3 explantes com 50% de cobertura por calo, nota 4 explantes com 75% de cobertura por calo, e por fim, nota 5 a qual toda superfície inicial do explante é coberta por calo.....	26
Figura 4. Diagnóstico visual dos níveis de oxidação.	27
Figura 5. Resumo esquemático da metodologia apresentada.....	32
Figura 6. Gráfico de frequência de material responsivo e não responsivo por tratamento após 30 dias de cultivo	33
Figura 7. Gráfico de frequência de material responsivo e não responsivo por tratamento após 60 dias de cultivo	34
Figura 8. Gráfico de cobertura de calo por explante responsivo no tratamento 06.....	35
Figura 9. Gráfico de cobertura de calo por explante responsivo no tratamento 08.....	35
Figura 10. Gráfico de cobertura de calo por explante responsivo no tratamento 09.....	36
Figura 11. Gráfico de cobertura de calo por explante responsivo no tratamento 10.....	36
Figura 12. Gráfico de cobertura de calo por explante responsivo no tratamento 12.....	37
Figura 13. Porcentagem dos explantes oxidados, por tratamento, no final de 30 dias de cultivo.....	38
Figura 14. Porcentagem dos explantes oxidados, por tratamento, no final de 60 dias de cultivo.....	38
Figura 15. Imagem à direita representa a morfologia externa de calo do tratamento T06. Fotomicrografia à direita apresenta células não embriogênicas, sem reação ao corante Carmim, sob indução do tratamento T06.....	39
Figura 16. Imagem à direita representa a morfologia externa de calo do tratamento T08. Fotomicrografia à direita apresenta células embriogênicas em coloração vermelha sob indução do tratamento T08. As setas em amarelo sinalizam as MPE encontradas no tecido.....	40
Figura 17. Imagem à direita representa a morfologia externa de calo do tratamento T09. Fotomicrografia à direita apresenta células não embriogênicas em coloração escura, devido a pouca afinidade com o corante Aceto Carmim.	40
Figura 18. Imagem à direita representa a morfologia externa de calo do tratamento T10. Fotomicrografia à direita apresenta células embriogênicas em coloração vermelha escuro, indicada por uma região mais externa do calo, como sinaliza a seta amarela.....	41
Figura 19. Imagem à direita representa a morfologia externa de calo do tratamento T12. Fotomicrografia à direita apresenta células embriogênicas em coloração vermelha. As setas em amarelo indicam as zonas onde se encontram as MPE.....	41
Figura 20. Calo não embriogênico aos 40 dias de cultivo em meio de cultura MS acrescido de 0,5mgL ⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mgL ⁻¹ de BAP, com estrutura rígida, tendo a superfície caracterizada por células mortas, ou vestígios de células originais do explante foliar (A); Células alongadas, provenientes de calos com 20 dias de cultivo, sinalizadas pela seta verde, característica de tecido não embriogênico, apresentando divisão celular irregular (B); Conjunto de células apresenta em calos com 40 dias de cultivo, células com maior dimensão, contudo sem potencial embriogênico (C); Células aos 60 dias de cultivos, apresenta divisão irregular e diferentes características celulares, como células alongadas e isodiamétricas.....	43
Figura 21. Micrografia de calo produzido em meio de cultura MS com adição de 0,5mgL ⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mgL ⁻¹ de BAP, aos 40 dias de cultivo, possibilitando visualizar a presença de agregados celulares, com células isodiamétricas e pouco espaço intercelular (A); Conjunto de células agregadas, com características embriogênicas em calo aos 20 dias de cultivo (B); Micrografia ampliada de um agregado celular, com características embriogênicas de um calo aos 40 dias de cultivo (C); Calo apresentando perda de potencial embriogênico, apresentando células isodiamétricas bem como alongadas, calo aos 60 dias de cultivo (D)	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação e concentração das soluções estoque do meio de cultura MS.	25
Tabela 2. Combinação das doses de 2,4-D e BAP originando 16 tratamentos diferentes para identificar o melhor balanço auxina/citocinina na indução de calos no explante estudado de teca	25
Tabela 3. Quantificação de proteínas totais solúveis dos tratamentos, T06 e T08, aos 40 dias de cultivo, bem como os níveis de proteínas nas plantas matrizes e nos explantes após o processo de desinfestação, expressos em mg de proteína por ml	45
Tabela 4. Atividade da CAT nos tratamentos, T06 e T08, aos 40 dias de cultivo, bem como nas plantas matrizes e nos explantes após o processo de desinfestação, expressos em $\mu\text{mol}/\text{mgprot}$	46
Tabela 5. Atividade da APX nos tratamentos, T06 e T08, aos 40 dias de cultivo, bem como nas plantas matrizes e nos explantes após o processo de desinfestação, expressos em $\mu\text{mol}/\text{mgprot}$	47
Tabela 6. Atividade da SOD nos tratamentos, T06 e T08, aos 40 dias de cultivo, bem como nas plantas matrizes e nos explantes após o processo de desinfestação, expressos em UnidadeSOD/mgprot	47
Tabela 7. Quantificação de MDA nos tratamentos, T06 e T08, aos 40 dias de cultivo, bem como nas plantas matrizes e nos explantes após o processo de desinfestação, expressos em $\eta\text{mol}/\text{gmatfresc}$	48
Tabela 8. Quantificação de peróxido de hidrogênio nos tratamentos, T06 e T08, aos 40 dias de cultivo, bem como nas plantas matrizes e nos explantes após o processo de desinfestação, expressos em $\mu\text{mol}/\text{gmatfresc}$	49

1. INTRODUÇÃO

A teca é nativa de países do sudeste asiático como Mianmar, Tailândia, Índia, Laos e Ilhas Java, e é a madeira tropical de mais elevado valor comercial devido a sua beleza estética, peso moderado, alta durabilidade, estabilidade dimensional e resistência a fatores ambientais externos (LUKMANDARU; TAKAHASHU, 2008). A madeira é usada para produção de móveis, barcos, decoração, laminação, paredes, assoalhos, carpetes, veículos e embarcações navais (BAILLÈRES; DURAND, 2000; BHAT; PRIYA; RUGMINI, 2001).

O Brasil apresenta o maior reflorestamento de teca na América do Sul, e as plantações são concentradas nas regiões Centro-oeste e Norte do país, nos estados de Roraima, Amazonas, Amapá, Pará, Acre, Rondônia, Mato Grosso, Tocantins e Minas Gerais (KOLLERT; CHERUBINI, 2012), principalmente nas cidades de Cáceres e Dom Eliseu (CASTRO, 2011).

Embora tenha grande visibilidade no mercado, pouco se sabe sobre plantios comerciais provenientes de mudas clonais, pois a propagação de teca ainda é realizada por sementes de fontes não selecionadas, e um problema para o cultivo da espécie no país está na falta de informações sobre a variabilidade genética das sementes disponíveis.

As sementes ainda possuem baixa taxa de germinação, influenciada por vários fatores como, o pericarpo espesso que limita a entrada de água e oxigênio para a semente, imaturidade fisiológica da semente e, inibidores químicos presentes no pericarpo (GUPTA ET AL., 1980; KUMAR, 1992; KAOSA, SUANGTHO E KJAER, 1998; ENTERS, 2000; GYVES, ROYANI E RUGINI, 2007; ANDRADE, 2010).

Uma alternativa à propagação seminal é a propagação vegetativa, que é de fundamental importância nos programas de melhoramento florestal (GERA, GERA e SINCH, 2000), permitindo a produção massal das árvores selecionadas em tempo e espaço reduzido conservando as características desejáveis. Esta alternativa oferece certas vantagens em relação à propagação tradicional por semente, por exemplo, consegue-se capturar o componente genético total (VIET, 1996). Entretanto, o processo de maturação comum em espécies lenhosas aumenta com o seu desenvolvimento ontogenético e constitui a principal barreira para a propagação vegetativa quando utilizadas matrizes adultas, o que reflete na redução do desenvolvimento das raízes, ou até mesmo na perda da capacidade de enraizamento (ANDRADE, 2010; HIGASHI e SILVEIRA, 2002; DAQUINTA et al., 2002; WENDLING e XAVIER, 2001; GREENWOOD, 1995; BONGA, 1993; HACKETT, MURRAY e SMITH, 1987).

Contudo, assim como outras espécies lenhosas, a propagação de matrizes já adultas é dificultada pelo processo de maturação, sendo a alternativa, obtenção de clones de tais indivíduos através do rejuvenescimento. O processo de rejuvenescimento pode ser realizado por várias técnicas. Sendo uma delas embriogênese somática através da cultura *in vitro*.

A embriogênese somática pode ser descrita como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem estruturas semelhantes à embriões zigóticos, por meio de uma sequência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas (GUERRA et al., 1999; JIMENEZ, 2001). Este processo é ideal para investigar o mecanismo de diferenciação em plantas, bem como a expressão da totipotência da célula vegetal. Incluem-se aqui, abordagens diferenciais da competência celular que é definida como o potencial de reprogramação de uma célula em resposta a sinais específicos, por meio de processos de desdiferenciação e rediferenciação (FEHER et al., 2003).

A etapa de indução da embriogênese somática é crucial para o estabelecimento de culturas embriogênicas *in vitro*. O processo de indução depende do genótipo, tipo e estágio de desenvolvimento do explante e, da composição do meio de cultura (LITZ et al., 1998). De acordo com Chalupa (1999), o estágio de desenvolvimento

dos embriões zigóticos utilizados como fonte de explante é fundamental para a expressão de seu potencial morfogênético e para o estabelecimento de culturas embriogênicas. Fatores relacionados à condição fisiológica do explante, às características da espécie e condições experimentais, como a atmosfera no interior dos frascos durante o cultivo podem ser fundamentais para o estabelecimento da competência e recepção dos sinais para desencadear o processo de diferenciação celular (FURTADO, 2010).

Sendo a indução da embriogênese um processo totalmente complexo, principalmente relacionado à recuperação de matrizes de espécies lenhosas, vê-se a necessidade de pesquisa de base que estude os processos envolvidos na propagação de espécies de interesse comercial, como a teca. Para que enfim possam surgir protocolos bem definidos de cultivo *in vitro* e que auxiliem na produção de mudas.

1.1 Objetivo Geral

Estudo da indução de calos embriogênicos em explantes foliares de teca (*Tectona grandis* L.f.).

1.2 Objetivos específicos

I - Identificar o balanço mais adequado auxina/citocinina para indução de calos embriogênicos em explantes foliares de teca, usando como fitorreguladores o 2,4-D e o BAP.

II - Analisar a ultraestrutura de calos embriogênicos e não embriogênicos

III - Estudar o estímulo do estresse oxidativo durante a embriogênese somática.

IV - Verificar possíveis alterações nas técnicas usadas para produção de calos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Tectona grandis* L.f.

A *Tectona grandis* L.f. é uma espécie arbórea, decídua, originária do continente Asiático, estando sua área de ocorrência confinada entre florestas úmida e decídua árida mista, em elevações em torno de 1.000 m na Índia, na Tailândia, no Laos, na Birmânia, no Camboja, no Vietnã e em Java (LAMPRECHT, 1990). Na atualidade, os plantios comerciais de teca, se estendem pela África Tropical, Austrália, Ilhas do Pacífico, América Central e do Sul (WHITE, 1991; PANDEY; BROWN, 2000). Diversas técnicas de implantação e de manejo silvicultural têm sido adotadas nos plantios de *Tectona grandis* L.f., resultando em grande produtividade de madeira, em uma rotação relativamente curta, quando comparada com os países de origem.

No Brasil os primeiros povoamentos comerciais de teca foram introduzidos na região do Centro-Oeste, no final da década de 60, com início da atividade em 1971 pela empresa Cáceres Florestal S.A., no sítio Castiçal do Jauru, na região de Cáceres, MT (TSUKAMOTO FILHO et al., 2003; CÁCERES FLORESTAL S/A, 2006; FIGUEIREDO et al., 2005). A implantação e desenvolvimento da teca nessa região deve-se a semelhanças climáticas com a região de origem, tropical quente e úmido, com inverno quente e seco segundo a classificação de Köppen Awa (1900).

No estado de Mato Grosso, é possível encontrar plantios comerciais com idade superior a 25 anos, com árvores apresentando características físicas e mecânicas semelhantes às encontradas no Sudeste e Sudoeste Asiáticos. O solo de melhor fertilidade, associado às práticas silviculturais compatíveis com a espécie, possibilitou a redução do ciclo de produção de 80 para 25 anos em média, com cinco desbastes planejados por ciclo (CÁCERES FLORESTAL S/A, 2006).

A teca começou a ser implantada na região norte do país apenas no ano de 1994, devido à necessidade de cumprir com a reposição florestal em atendimento com a legislação ambiental, sem receber tratamentos silviculturais ou investimentos relacionados à qualidade do solo, pois a produção de madeira não correspondia ao principal interesse do produtor (FIGUEIREDO et al., 2005).

Estima-se que a área de reflorestamento de teca no mundo chegue a 4,3 milhões de hectares, sendo 83% concentrados na Ásia, 11% na África e 6% na América tropical. Na região asiática, Índia e Indonésia possuem 44% e 31% da área plantada da espécie, respectivamente (CAMINO; MORALES, 2013).

Devido ao alto retorno financeiro da atividade, existe um grande movimento de aumento das áreas de reflorestamento no Brasil (SHIMIZU et al., 2007), tanto em monocultura, quanto em sistema de integração. Segundo a Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Mato Grosso, FAMATO (2013), no ano de 2007 a área de teca no estado de Mato Grosso correspondia a 48.526 ha. Quando se compara a extensão dos plantios de 2006 para 2010, a área de reflorestamento com a espécie cresceu 11.474 ha, atingindo 60.000 ha, correspondendo a um crescimento de 23,54% em quatro anos, evidenciando o interesse econômico pelo cultivo comercial. Ainda de acordo com a FAMATO (2013) existia uma área correspondente ao plantio de teca no estado de Mato Grosso de 64.828 hectares no ano de 2012.

Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas, ABRAF (2008), o consumo de madeira em tora de floresta plantada para fins industriais cresceu aproximadamente 39% entre os anos de 2002 e 2007, de 111,6 milhões de m³ para 155,6 milhões m³. No ano de 2007, no consumo de madeira em tora de floresta plantada, ocorreu um crescimento de 2,5% com relação ao ano anterior. Devido à busca por um produto final mais

homogêneo, de melhor qualidade e com ciclo produtivo reduzido, desenvolveram-se pesquisas relacionadas à clonagem e ao melhoramento da espécie.

No entanto, a produtividade destes plantios florestais homogêneos apresenta números extremamente variáveis (FIGUEIREDO, 2005). Alguns autores sugerem como prováveis causas dessa alta variabilidade na produtividade da espécie, as diferenças de localidade, as diferenças nas condições de manejo florestal, as diferenças entre procedências, a baixa qualidade das sementes ou de mudas, dentre outros fatores (KJAER; FOSTER, 1996; GOH; MONTEUUIS, 2005; BARROSO et al., 2005). No entanto, sabe-se que a produtividade pode aumentar substancialmente, a partir de seleção cuidadosa de procedência e de genótipos superiores (GOH; MONTEUUIS, 2005).

Nos últimos 20 anos, têm-se desenvolvido programas de melhoramento genético de teca, concentrando-se principalmente na clonagem de árvores de genótipo superior (NICODEMUS et al. 2000; MURILLO; BADILLA, 2004), sendo o resgate vegetativo de material adulto em campo uma etapa fundamental, tanto para o desenvolvimento de um programa de melhoramento quanto para a conservação de genótipos de interesse (WENDLING, 2003). Segundo Alfenas et al. (2009), o primeiro passo, após a seleção de árvores superiores é a obtenção de brotações fisiologicamente e ontogeneticamente juvenis. De forma geral, quando se objetiva reproduzir vegetativamente um material com características desejadas, o primeiro passo é o resgate do genótipo em condições de campo e obtenção de brotações com maior aptidão ao enraizamento adventício (WENDLING; XAVIER, 2001).

A dificuldade no enraizamento de estacas de espécies lenhosas está relacionada ao grau de maturação, sobre o qual se tem observado que na fase juvenil as plantas possuem maior potencial de enraizamento que na fase adulta (HARTMANN et al., 2011). A técnica mais comumente utilizada no resgate vegetativo para a propagação de plantas adultas de espécies florestais tem sido a decepa da árvore para a indução de brotações basais (MURILLO et al., 2003). As brotações emitidas nas cepas possuem características morfológicas e fisiológicas das plantas juvenis, as quais são de fundamental importância para a recuperação da competência ao enraizamento adventício (ALFENAS et al., 2009; XAVIER et al., 2013).

Segundo Wending e Xavier (2001) a técnica mais eficiente para o rejuvenescimento de espécies florestais é a micropropagação, contudo, existem espécies que tornam inviável a prática da propagação *in vitro* devido à falta de conhecimento específico, pelo elevado custo ou mesmo pelo número insuficiente de subcultivos (HACKET, 1985). E para o sucesso na prática da micropropagação são necessárias aplicações externas de reguladores de crescimento, pois estes estão relacionados às características juvenis dos tecidos vegetais (GIOVANELLI; GIANNINI, 1999).

2.2. Reguladores de crescimento vegetal

A palavra hormônio é originária do grego e significa "estímulo" (RAVEN, 2007; VIEIRA, 2011). Os fitohormônios, ou "hormônios vegetais", quando associados aos fatores externos desencadeiam o processo de crescimento e diferenciação celular, além de sincronizarem o desenvolvimento da planta de acordo com as alterações ambientais, e são responsáveis pela intensidade e orientação do crescimento, da atividade metabólica, do transporte, do estoque e mobilização de substâncias nutritivas (LARCHER, 2000; PEREIRA et al., 2010).

As substâncias sintéticas, as quais desempenham a mesma função dos fitohormônios, são chamadas de "reguladores de crescimento vegetal". Segundo Casillas et al. (1986), os reguladores de crescimento, quando aplicados

em baixas concentrações em tecidos vegetais, favorecem o bom desempenho dos processos vitais da planta e garantem rendimentos satisfatórios em condições ambientais adversas.

Com a intensificação dos programas de reflorestamento existe uma crescente demanda para produção de mudas de espécies florestais. Contudo, dentre essas espécies de interesse podemos encontrar aquelas com baixas taxas de produção de sementes e germinação, como é o caso da teca. Neste caso, as espécies devem ser propagadas vegetativamente.

Os hormônios vegetais regulam processos fisiológicos em árvores, incluindo crescimento (SAVIDGE; WAREING, 1984) e a reprodução (KONG et al., 2012). A propagação vegetativa, técnica utilizada para a obtenção de clones, é descrita como a multiplicação de um vegetal a partir de um tecido que tenha a capacidade de reassumir sua atividade meristemática (FERREIRA, 2009). Neste caso, o regulador de crescimento aplicado no tecido vegetal tem como função facilitar e acelerar a produção de descendentes com características homogêneas (DIAS et al., 1999).

A propagação vegetativa *in vitro*, também conhecida como micropropagação, é favorecida quando os tecidos vegetais são cultivados em meio de cultura asséptico constituído de solução nutritiva e dois principais reguladores de crescimento, as auxinas e as citocininas sintéticas.

As auxinas são importantes para o desenvolvimento e a regulação do crescimento vegetal. O efeito fisiológico de cada auxina no tecido em desenvolvimento da planta, referente ao crescimento e morfogênese, difere em termos de adesão, conjugação, transporte e metabolismo dentro dos tecidos da planta (NAKHOODA et al., 2011).

Com uma capacidade marcante no processo de divisão celular estão os reguladores de crescimento denominados citocininas (MOURA et al., 2012). Para Hall (1975), as citocininas são substâncias que promovem o crescimento e a diferenciação em cultura de calo. Além de serem essenciais para divisão celular, as citocininas promovem alterações na taxa metabólica, na indução e formação de órgãos, na atividade enzimática e na mobilização de nutrientes (PERES; KERBAUY, 2004; SOARES et al., 2011).

Na maioria dos modelos de embriogênese somática, as auxinas são usadas em concentrações relativamente elevadas, e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos mais utilizados nos processos de desdiferenciação celular. É um potente sinalizador no processo de rediferenciação, induzindo a produção de embriões somáticos diretos, sem passar pela fase de calogênese (GUERRA et al., 1999).

A eficiência dos explantes em gerar calos depende da determinação dos tecidos vegetais e de sua especificidade. Algumas espécies são induzidas apenas com 2,4-D, enquanto outras necessitam da combinação de diferentes fitorreguladores, como a 6-benzilaminopurina (6-BAP) (NEWMAN et al., 1996).

Dentre as citocininas, a BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies lenhosas. Alguns dados sugerem que essa citocinina parece ser, por excelência, a mais indicada para promover a proliferação de partes aéreas e indução de gemas adventícias *in vitro* (HU; WANG, 1983).

Os casos de sucesso de micropropagação de espécies florestais advêm principalmente do uso correto de reguladores de crescimento de plantas, tendo destaque as auxinas e citocininas. A definição do meio de cultura adequado para cada espécie, o regulador de crescimento e sua concentração são imprescindíveis para o sucesso da propagação de culturas *in vitro* (LEITZKE et al., 2010). Desta forma, a descoberta de novos protocolos de micropropagação estão diretamente dependentes da reformulação de meios nutritivos já existentes (LLOYD; MCCOWN, 1980).

2.3. Embriogênese somática

A embriogênese somática é uma excelente ferramenta na pesquisa da biologia das árvores, capacitando o estudo de desenvolvimento, fisiologia, resistência à doenças, genômica, metabolômica, proteômica, epigenética, e outras pesquisas complementares (PARK e BONGA, 2010).

Atualmente, uma parte significativa das pesquisas sobre embriogênese somática em árvores é focada no desenvolvimento da planta, começando da indução de embriões somáticos e terminando com a aclimatização e desenvolvimento de mudas em condições naturais. Em árvores, a embriogênese somática é um processo altamente complexo (ROBERTS et al., 1991; BOZHKOV et al., 2002; HAZUBSKA-PRZYBYL e BOJARCZUK, 2008), podendo ser dividida em várias etapas: iniciação da cultura, proliferação, maturação e germinação *in vitro*.

Pode ser induzida em vários tipos de explantes, como embriões maduros ou imaturos obtidos de sementes, gemas e folhas (TORIBIO et al., 2004; NAWROT-CHORABIK, 2012) ou meristemas apicais (SANJOSE et al., 2010). Alguns explantes regeneram um tipo específico de explante (tecido embriogênico) na presença de reguladores de crescimento de plantas (geralmente citocininas e/ou auxinas).

Tecidos embriogênicos contêm estruturas pró embriogênicas, os quais são análogos a estágios particulares da embriogênese zigótica presente em sementes normais. Esses tecidos podem ser mantidos por um longo período em condições *in vitro*, ou em nitrogênio líquido. Sob o efeito de condições físico-químicas (ABA, BA, luz, aumento de pressão osmótica), partes desses tecidos são capazes de produzir embriões somáticos (KLIMASZEWSKA et al., 2000; BOZHKOV et al., 2002; HAZUBSKA-PRZYBYL e BOJARCZUK, 2008).

Atualmente, a técnica da embriogênese somática é muito efetiva para um pequeno número de espécies incluindo, gramíneas, arbustos, e pinus (BONGA, 2016).

Até agora, embriões zigóticos maduros e imaturos, como por exemplo em *Q. robur* (CHMIELARZ, 1999) foram os explantes mais usados para indução da embriogênese somática em muitas espécies arbóreas. Entretanto, durante a última década, avanços importantes tem sido feitos nessa área, e outros tipos de explantes (folhas, meristema apical, gemas laterais) derivadas de árvores mais velhas foram usadas para induzir esse processo.

Toribio et al. (2004) conseguiu induzir a embriogênese somática em folhas de uma árvore de cem anos de idade de *Quercus robur*. Mesmo tendo uma frequência baixa, um grande número de embriões foram obtidos pela embriogênese secundária.

Em *Quercus suber*, a embriogênese somática foi obtida tanto por folhas derivadas de mudas de dois a quatro meses de idade como folhas de árvores centenárias (TORIBIO et al., 2005). Algumas folhas começaram a regenerar embriões somáticos depois de aproximadamente 60 dias de cultura.

Embora existam alguns resultados positivos na obtenção de embriões somáticos em espécies arbóreas, um dos maiores desafios da pesquisa no melhoramento florestal é melhorar a qualidade de embriões somáticos produzidos e reduzir o preço de produção do material proveniente desta técnica para um nível que permita a implementação da mesma em grande escala (LELU-WALTER et al., 2013; THOMPSON, 2014).

2.4. Análises histoquímica e ultraestrutural

As análises microscópicas, tanto histoquímicas quanto ultraestruturais, são estratégias que possibilitam o aumento do conhecimento sobre o comportamento celular de calos e da eficiência do processo embriogênico. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é utilizada há anos em estudos de embriogênese somática e

organogênese com o intuito de fornecer maiores detalhes da morfologia externa das células embriogênicas (NOGUEIRA et al., 2007). A MEV possibilita visualizar estruturas, processo regenerativo e caracterizar os estágios embriogênicos em globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, bem como indentificar a formação anormal de embriões somáticos (PESCADOR et al., 2008). Algumas características observadas pela MEV também podem ser visualizadas através da análise histoquímica, com a utilização de corantes químicos. O estudo do desenvolvimento de células ou grupos de células por técnicas histológicas também tem sido utilizado para o entendimento da embriogênese somática em várias espécies vegetais (MOURA, 2007)

As principais características das células embriogênicas são a rápida divisão mitótica, forma isodiamétrica entre si, com núcleo volumoso e nucléolo proeminente, citoplasma denso, vacúolo pequeno e presença marcante de grãos de amido. De acordo com Stein et al. (2010), células com as características descritas apresentam uma síntese de RNA intensa e alta atividade metabólica.

Analisando calos de Ingá vera Stein et al. (2010) encontraram diferenças entre células dos calos de anteras, ovários, segmentos nodais e folhas através da MEV. Trabalhando com calos em cotilédones de maracujazeiro, Carvalho et al. (2013) encontraram diferenças ultraestruturais relacionadas com a coloração dos calos. Com auxílio da MEV, foi possível observar que calos com coloração branca e amarelo escuro eram constituídos por células pequenas isodiamétricas bem organizadas, indicando possível potencial embriogênico.

O uso das análises histoquímicas e ultraestruturais vão além de diagnósticos relacionados a estrutura, histologia e morfologia, elas também possibilitam a visualização de possíveis falhas durante o processo embriogênico, fornecendo informações importantes sobre o cultivo *in vitro*.

2.5. Bioquímica do estresse

As plantas são organismos sésseis e tem uma relação bem estabelecida com o ambiente onde se encontram e são dependentes dos recursos específicos e condições de vida que existem ao seu redor. Como todos os parâmetros ambientais são dinâmicos, as plantas devem assegurar sua contínua adaptação.

O ambiente tem uma influência drástica na forma da planta, o que resulta em uma extensa plasticidade fenotípica (SULTAN, 2000). Para otimizar a captação de recursos, bem como para desenvolver em condições desfavoráveis, as plantas mantém o crescimento ilimitado, tudo isto graças a permanência de células meristemáticas ativas em locais específicos do corpo da planta. Tais células se perpetuam por divisões celulares as quais originam células derivadas que são responsáveis por se diferenciarem em novos tecidos e órgãos (SCHERES, 2007).

No caso das plantas, a formação dos órgãos é, em sua maioria, pós embriogênica, continua, e fortemente influenciada pelo ambiente. As células somáticas vegetais são consideradas diferenciadas, contudo mais flexíveis em relação a determinação, quando comparadas as células animais. Acredita-se que células vegetais diferenciadas sob certas circunstâncias podem reverter-se para estágios anteriores do desenvolvimento (desdiferenciação) e podem reobter pluri ou totipotência. Consequentemente, as células mudam a sua determinação sob influência hormonal e ambiental e regeneram novos tecidos, órgãos ou um novo indivíduo. Até recentemente, este fenômeno era considerado responsável por uma série de habilidades das plantas. Dados indicam, entretanto, que sob condições *in vitro* a regeneração de ápices e raízes podem também ser iniciadas de células meristemáticas adultas presentes ao redor dos vasos condutores presentes no corpo da planta (SUGIMOTO, 2010). Contudo este levantamento trouxe em debate o assunto do ganho de pluri/totipotência de células vegetais diferenciadas.

É bem aceito que o processo de troca de desenvolvimento que resulta na embriogênese somática seja acarretado em células transientes expostas a um forte estresse e/ou a uma concentração de reguladores de crescimento. De acordo com os modelos aceitos por pesquisadores, a indução resulta na desdiferenciação de células vegetais somáticas seguido ou paralelo à reaquisição da totipotência. No estágio totipotente, as células estão competentes a perceber sinais de desenvolvimento apropriados para início da embriogênese, o que ocorrerá automaticamente em condições apropriadas tanto *in planta*, quanto *in vitro*.

Um dos pontos marcados da embriogênese vegetal *in vitro* é a variedade de condições de cultivo que são capazes de iniciar o desenvolvimento de embriões incluindo tratamentos hormonais e de estresse (ZAVATTIERI et al., 2010).

Devido o ambiente *in vitro* ser totalmente manipulado para a propagação da cultura vegetal, as plantas ou explantes, que são inoculados *in vitro* e que passam por sucessivos subcultivos, estão sujeitos às condições ambientais e culturais incomuns, contrapondo-se às condições de cultivo nas casas de vegetação e no campo (GASPAR et al., 2002). Dentre estas condições, destaca-se a alta umidade relativa no interior dos frascos; o acúmulo de gases, especialmente o etileno; concentrações elevadas de reguladores de crescimento, comumente representados pelas auxinas e citocininas; acúmulo de substâncias tóxicas; elevados teores de açúcar, entre outros.

Estes fatores incomuns do ambiente *in vitro* favorecem dois tipos de estresse, um benéfico para o desenvolvimento vegetal e outro com aspectos negativos sobre a morfogênese vegetal. De acordo com Pinto et al. (2010), um estresse suave ativa o metabolismo celular, promovendo a atividade fisiológica da planta e induzindo uma resposta defensiva ou adaptativa.

O estresse *in vitro* reflete-se na forma de estresse oxidativo, que é definido como um desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes versus compostos oxidantes, culminando com a elevada formação de espécies reativas de oxigênio (ROS - reactive oxygen species) (PINTO et al., 2010), as quais atacam moléculas vitais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, promovendo distúrbios estruturais, metabólicos e fisiológicos em células, podendo conduzi-las à morte (BRAY; BAILEY; WERETILNYK, 2000).

As espécies reativas de oxigênio são produzidas naturalmente nas plantas, em especial pela cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto e mitocôndria e pela fotorrespiração (DAT et al., 2000) e desempenham um papel importante na sinalização do crescimento e desenvolvimento das plantas, ao alterarem o padrão de expressão gênica, metabolismo celular e totipotência.

A partir desses conhecimentos, é benéfico e requerido um nível baixo de estresse oxidativo para desencadear uma determinada rota morfogênica (OBERT et al., 2005; BLAZQUEZ et al., 2009).

O fato das plantas desenvolverem ao longo da evolução uma rede elaborada e eficiente de mecanismos de remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e passarem a utilizar estas moléculas tóxicas como mediadoras da transdução de sinal (BAILEY-SERRES E MITTLER, 2006 e MITTLER et al., 2004) tornou claro o papel duplo das ROS como compostos tóxicos, e como reguladoras chaves de muitos processos biológicos, tais como crescimento, ciclo celular, morte celular programada, sinalização hormonal, resposta celular aos fatores bióticos e abióticos e desenvolvimento (FOYER; NOCTOR, 2005; FUJITA et al., 2006 apud MILLER; SHULAEV; MITTLER, 2008; MITTLER et al., 2004).

Foi a evolução de um mecanismo altamente eficiente das células vegetais que possibilitou a superação da toxicidade das espécies reativas de oxigênio (ROS), e sua utilização como sinalizadoras moleculares (BAILEY-SERRES; MITTLER, 2006). Um destes mecanismos, que compõe o sistema antioxidante, é representado pelas enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), entre outras.

A SOD é a primeira enzima a agir no sistema antioxidante da célula, catalisando a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir de radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) (OLMOS et al., 2003). O H_2O_2 pode ser acumulado nos tecidos, tornando-se tóxico e prejudicial ao atravessar as membranas celulares e promover a peroxidação lipídica (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). O H_2O_2 é então neutralizado pela ação da CAT, resultando em água e oxigênio estável.

Enquanto que a APX, diferenciando-se da CAT, controla o H_2O_2 na ordem de micromolar (μM) e em localizações mais específicas do que a CAT, sendo responsável pelo controle dos níveis de ROS para efeitos de sinalização molecular (MITTLER, 2002).

Para estabelecer o nível fixo de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é indispensável o equilíbrio das atividades da SOD, APX e CAT (BOWLER et al., 1991).

Adicionalmente aos antioxidantes enzimáticos, as células também apresentam antioxidantes de baixo peso molecular, não enzimáticos, como glutatona, ácido ascórbico, tocoferol e compostos fenólicos.

Responsáveis pela peroxidação lipídica, os compostos fenólicos são compostos secundários muito abundantes nos tecidos vegetais, que graças às propriedades redutoras e estrutura química, desempenham uma função essencial na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo do início ao fim do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007).

A indução da peroxidação lipídica é decorrente da reação das espécies reativas de oxigênio (ROS) com ácidos graxos insaturados, com consequente peroxidação de lipídios de membranas essenciais da plasmalema ou de organelas intracelulares (SCANDALIOS, 1993), ocasionando alterações na funcionalidade e integridade das membranas, com possibilidade da ocorrência de danos irreversíveis.

A peroxidação dos lipídios das biomembranas é um dos principais indicadores da ocorrência do processo de estresse oxidativo. Desta forma, para averiguar a ocorrência da peroxidação lipídica, e consequentemente de estresse oxidativo, é frequentemente utilizado como indicador o malondialdeído (MDA), um dos vários produtos de baixo peso molecular formado através da decomposição de produtos da peroxidação lipídica (VITTORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005; DEWIR et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no laboratório de Fisiologia das árvores no departamento de Ciências Florestais, e após a coleta de material as análises foram realizadas em laboratórios parceiros, sendo eles: laboratório de Microscopia Eletrônica no Departamento de Fitopatologia e Nematologia, laboratório de Anatomia, Identificação e Densimetria de Raios X em Madeira, também junto ao departamento de Ciências Florestais, e laboratório de Genética Bioquímica de Plantas no departamento de Genética. Todos os laboratórios mencionados estão situados na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo em Piracicaba, São Paulo.

3.2. Material vegetal

O material vegetal utilizado foram explantes provenientes da nervura principal de folhas jovens, saudáveis de matrizes de teca (Figura 1). Foram cinco matrizes, todas provenientes de um mesmo material genético e 5 anos de idade. As mesmas estavam envasadas no viveiro do departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, recebendo irrigação diária e fertilização semanal.

Figura 1. Explante da nervura principal de folha de teca proveniente do terço mediano da folha indicada na imagem "C" pela seta amarela.

3.3. Desinfestação

Após a coleta das folhas, as mesmas foram levadas para o laboratório de Fisiologia das Árvores, onde primeiramente foram cortadas deixando apenas a região do limbo foliar onde se encontrava a nervura principal, em seguida, as regiões seccionadas foram lavadas e escovadas com sabão antibacteriano líquido e, então, enxaguadas em água corrente. Em sequência da lavagem inicial, o material selecionado foi deixado em água corrente por um período de trinta minutos. Após a segunda lavagem o material foi banhado duas vezes com álcool 70% durante o período de um minuto, cada uma das vezes. Em seguida do banho em álcool, realizou-se três enxagues com água destilada.

autoclavada. Por fim, foi realizada a imersão dos tecidos durante 20 minutos em hipoclorito de sódio comercial com 2,0 a 2,5% de cloro ativo em solução 70% v/v. Ao fim deste processo o material foi levado à câmara de fluxo laminar, ainda imerso na solução de hipoclorito, onde foi enxaguado três vezes com água destilada autoclavada, em abundância, e então inoculado em meio de cultura a qual será descrito posteriormente.

3.4. Indução de calos

Após o processo de assepsia do material, os seguimentos de folhas foram cortados de modo a retirar o excesso do limbo foliar, deixando somente a região da nervura principal da folha. Além disso, foram descartadas as regiões próximas ao pecíolo, bem como a região terminal da nervura. Da seção remanescente foram, então, cortados explantes no tamanho 1cmx1cm preservando a região da nervura (Figura 2).

Figura 2. Em azul estão destacadas as seções descartadas do material após o processo de assepsia ao lado esquerdo da imagem. Na imagem da direita explantes foliares inoculados em meio de cultura para indução de calos embriogênicos.

Para cultivo dos explantes foi utilizado o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) a qual foi adicionado 30g L⁻¹ de sacarose, em seguida o pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8 e, por fim, adicionado 5 g L⁻¹ de ágar (Tabela 1) para obtenção do meio semi-sólido.

Ao meio de cultura original, MS, foram acrescidas diferentes combinações de concentrações de reguladores de crescimento, sendo testadas doses de 2,4-D (auxina) e BAP (citocinina) (Tabela 2) para indução de calos embriogênicos. O meio de cultura foi vertido em frascos de vidro de 350 mL, onde cada frasco foi completado com 25ml de meio de cultura e autoclavado a 121°C, 1,0Kg_fcm⁻² durante 20 minutos.

Tabela 1. Relação e concentração das soluções estoque do meio de cultura MS.

Meio de cultura MS		
Classificação	Substância	Dose (g L ⁻¹)
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	165,00
	KNO ₃	190,00
	KH ₂ PO ₄	17,00
	CaCl ₂ .2H ₂ O	44,00
	MgSO ₄ .7H ₂ O	37,00
	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78
	Na ₂ EDTA	3,73
Micronutrientes	MnSO ₄ .H ₂ O	1,69
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025
	H ₃ BO ₃	0,62
	KI	0,083
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025
Misturas Orgânicas	Ácido Nicotínico	0,05
	Piridoxina	0,05
	Tiamina	0,01
	Meso Inositol	10,00
	Glicina	0,20

Cada tratamento teve um total de quatro repetições, sendo a repetição composta por um frasco contendo quatro explantes foliares. Os explantes eram provenientes de um mix de folhas das cinco matrizes (clones).

Tabela 2. Combinação das doses de 2,4-D e BAP originando 16 tratamentos diferentes para identificar o melhor balanço auxina/citocinina na indução de calos no explante estudado de teca

Doses		BAP (mg L ⁻¹)			
2,4-D / BAP		0,0	0,1	0,5	2,0
2,4-D (mg L ⁻¹)	0,0	0,0/0,0 (T1)	0,0/0,1 (T2)	0,0/0,5 (T3)	0,0/2,0 (T4)
	0,5	0,5/0,0 (T5)	0,5/0,1 (T6)	0,5/0,5 (T7)	0,5/2,0 (T8)
	2,0	2,0/0,0 (T9)	2,0/0,1 (T10)	2,0/0,5 (T11)	2,0/2,0 (T12)
	4,0	4,0/0,0 (T13)	4,0/0,1 (T14)	4,0/0,5 (T15)	4,0/2,0 (T16)

A indução dos calos teve uma duração de 60 dias, sendo realizadas duas transferências de meio de cultura, sendo a primeira transferência de cultivo aos 20 dias após a introdução e a segunda transferência de cultivo 40 dias após a introdução. Durante todo esse período o material foi cultivado em sala de crescimento à temperatura de 26°C +- 2, na ausência de luz.

3.5. Seleção de material responsivo

3.5.1. Avaliação da frequência e cobertura de explantes por calos

Os dezesseis tratamentos da fase de indução de calos foram avaliados aos 60 dias após a introdução quanto ao parâmetro descrito a seguir. Presença ou ausência de calos, sendo considerada presença calos de qualquer estrutura, cor e tamanho. Cobertura do explante por estrutura calosa, sendo atribuídas notas de um a cinco, de acordo com a porcentagem do explante avaliado coberta por estrutura calosa (Figura 3).

Figura 3. Avaliação do parâmetro "cobertura por calos" onde a nota 1 representa 0% de cobertura do explante por calo, nota 2 representa 25% de cobertura do explante por calos, nota 3 explantes com 50% de cobertura por calo, nota 4 explantes com 75% de cobertura por calo, e por fim, nota 5 a qual toda superfície inicial do explante é coberta por calo.

3.5.2. Avaliação visual da oxidação

Também foi realizada aos 30 e 60 dias de cultivo a avaliação da oxidação dos explantes de acordo com a coloração do material vegetal, com ou sem cobertura calosa. Foram atribuídas denominações para intensidade de oxidação de acordo com a coloração apresentada pelo explante (Figura 4).

Figura 4. Diagnóstico visual dos níveis de oxidação.

3.5.3. Análise histoquímica

Após os 60 dias de cultivo, para os materiais responsivos que apresentavam formação calosa, foram realizados testes histoquímicos para a confirmação da presença de linhagens celulares embriogênicas. Realizou-se, então, aleatoriamente a coleta de amostras constituídas de 100mg de calos por tratamento responsivo, as quais foram maceradas em um vidro de relógio com auxílio de um bastão de vidro. Cada tratamento teve suas amostras maceradas separadamente. Ao material macerado foram adicionadas entre 3 a 5 gotas de corante carmim acético (2%) (peso/volume) por 2 a 3 minutos, o excesso do corante foi retirado e em seguida foram confeccionadas lâminas de microscopia de luz com o material corado. Já dispostas sobre as lâminas, adicionou-se duas gotas de glicerina por lâmina, e estas, então, cobertas com uma lamínula. As lâminas prontas para análise microscópica receberam leves batidas com um bastão de vidro, para espalhar o material. Para cada tratamento responsivo quanto à produção de calos foram montadas 10 lâminas, sendo essas provenientes de um mesmo calo, conforme o procedimento descrito acima. Em seguida as amostras foram fotomicrografadas em microscópio de luz. As imagens foram tratadas no software GIMP2 e então avaliadas quanto cobertura de tecido corado pela coloração vermelha (linhagens embriogênicas).

3.6. Reintrodução

Após a análise dos materiais responsivos foram selecionados dois tratamentos para realizar-se em sequência as análises de microscopia eletrônica de varredura e análise bioquímica do estresse. Os dois tratamentos selecionados são aqueles com melhor resposta embriogênica, T8, e aquele com menor resposta embriogênica, T6, ambos selecionados de acordo com os parâmetros avaliados previamente, frequência de calos, cobertura de calos por explante e análise histoquímica. Contudo, para a execução das análises ultraestruturais e bioquímicas foi necessária uma reintrodução, assim como descrito nos itens 3.2, 3.3 e 3.4. Para realizar a reintrodução foram utilizadas as mesma cinco matrizes.

3.7. Análise de microscopia eletrônica de varredura

3.7.1. Coleta de material

Para análise ultraestrutural foram coletadas quatro amostras (explantes) de material vegetal dos dois tratamentos (T8 e T6) durante três fase do período de indução da embriogênese somática, sendo 20, 40 e 60 dias de cultivo, totalizando desta forma 12 amostras por tratamento.

3.7.2. Preparo do material

Amostras de calos do cultivo inicial, 20 dias, e dos dois subcultivos, 40 e 60 dias, foram imersas em solução fixadora Karnovsky (1965) (pH 7,2), em microtubos de 2ml. Em seguida, as amostras foram passadas por vácuo por cinco minutos. Durante o procedimento de vácuo os microtubos foram mantidos abertos, para evitar a obstrução e possíveis danos às amostras. O procedimento de vácuo foi repetido três vezes, sendo que, entre uma operação e outra, as amostras eram agitadas manualmente, de forma delicada, para favorecer o processo de infiltração da solução Karnovsky. Após este processo de fixação o fixador foi descartado e as amostras foram lavadas por três vezes em água destilada e em seguida desidratadas por uma série alcoólica de 10, 30, 50, 70, 90 e 100 % (etanol diluído em água). Em cada passo da série o material ficou submerso por um período de dez minutos, repetindo-se o ultimo passo duas vezes.

3.7.3. Análise de Microscopia eletrônica de varredura

Após a desidratação, as amostras foram montadas em *stubs* de metal e submetidas ao aparelho de ponto crítico para a secagem. Por fim, o material passou pelo processo de metalização, sendo assim recoberto por uma lâmina de ouro. Com as amostras prontas, o material foi observado e fotomicrografado no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO 435 VP.

3.8. Análise bioquímica

3.8.1. Coleta do material

A análise bioquímica foi realizada em diferentes períodos do processo de reintrodução e cultivo *in vitro*. A primeira coleta foi realizada no mesmo momento em que realizou-se a reintrodução. Ao coletar-se as folhas para a introdução dos explantes foi coletada cerca de 1,3 gramas de matéria fresca das folhas das matrizes, visando analisar a sanidade do material original, isto é, diagnosticar se as plantas matrizes estavam em boas condições fisiológicas de fornecerem bons explantes. Após cinco dias de cultivo *in vitro* foram coletadas, também, 1,3 gramas de matéria fresca de um blending de explantes já cultivados em meio de cultura com os tratamentos 06 e 08. O blending foi obtido através da seleção ao acaso do material *in vitro*, mantendo a proporção 1:1 de explantes provenientes de cada tratamento, ou seja, 0,65g de material fresco proveniente do tratamento 06, e 0,65g de material fresco proveniente do tratamento 08. A coleta ao quinto dia de cultivo foi realizada com o intuito de verificar a reação do material pós

processo de desinfestação. Aos 40 dias de cultivo 1,3g de matéria fresca foram coletadas de cada um dos dois tratamentos (T6 e T8). A análise referente aos 40 dias de cultivo tem por finalidade estudar as diferenças bioquímicas no material vegetal submetido aos dois diferentes tratamentos. Em cada uma das três coletas realizadas o material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, permanecendo acondicionadas em freezer a -80 °C, até o início das análises.

3.8.2. Extração enzimática

Foram pesados 1g de cada uma das amostras, e então maceradas com nitrogênio líquido em almofariz com auxílio de mortar. Ao material macerado foi adicionado o tampão de extração, conforme a composição a seguir, na proporção 1:3 (1g de tecido/ 3 ml de tampão). O homogeneizado foi, então, centrifugado a 10000 rpm durante 30 minutos à 4°C. Posteriormente, 2,5ml do sobrenadante foi coletado e passado por coluna PD-10 (Sephadex G-25) com o intuito de retirar compostos fenólicos. O uso da coluna se tornou primordial para manter a qualidade dos extratos para purificação de proteínas e para a determinação da atividade enzimática. O material filtrado foi dividido em alíquotas de 350µl em microtubos de 0,5ml e estocado em freezer -80°C até o momento das análises.

Tampão de extração: Tampão tris-HCl 100mM (pH7,5), acrescido de 7% de sacarose, 14mM β -mercaptoetanol, 250mM de ácido ascórbico, 20mM de DTT, 20mM de metabissulfato de sódio, 200mM de tetraborato de sódio, 10% de PVPP, 10mM de KCl e 10mM de $MgCl_2$.

3.8.3. Determinação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada por espectrofotometria a 595 nm (Lambda 40, Perkin Elmer), segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão. Os resultados foram expressos em mg proteína/mL.

3.8.4. Atividade da catalase - CAT

Como descrito por Kraus et al. (1995) e com modificações realizadas por Azevedo et al. (1998), a atividade da Catalase foi determinada em espectrofotômetro Perkin Elmer - Lambda 40.

A determinação ocorreu a 25°C em solução contendo 1mL de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,5) e 25µL de extrato protéico e atividade determinada seguindo-se a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por um minuto, através das alterações na absorbância a 240nm. Os resultados foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

3.8.5. Atividade da ascorbato peroxidase - APX

A atividade da APX foi determinada em espectrofotômetro, seguindo o método de Nakano e Asada (1981), pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a 30 °C. O meio de reação foi composto

por tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), 0,5 mM de ascorbato, 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de H₂O₂ e 100 µL de extrato enzimático, em um volume total de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição do ascorbato. O decréscimo na absorbância foi monitorado em intervalos de 10 segundos, até totalizar 60 segundos. Os resultados foram expressos em mmol/minuto/mg de proteína.

3.8.6. Atividade da superóxido dismutase - SOD

A atividade da superóxido dismutase foi determinada em espectrofotômetro de acordo com Giannopolitis e Reis (1997) e Cembrawska-Lech et al. (2015). A reação foi conduzida em uma câmara de reação sob iluminação de lâmpada fluorescete a 25°C. A cada amostra foi adicionado um meio de reação composto por tampão fosfato 50mM (pH 7,8) + metionina 13mM + NBT 63µM + EDTA 0,1mM + riboflavina 1,3µM, totalizando 1,5mL de reação. Para os brancos fez-se a mesma reação, contudo sem o extrato da amostra, sendo que o branco do escuro permaneceu fora da câmara, tampado com papel alumínio, para que não houvesse contato com a luz. Já o branco do claro foi colocado na câmara junto com as amostras.

A reação foi colocada no interior da câmara e tampada para não permitir o contato com qualquer fonte de luz exterior. A luz do interior da câmara permaneceu cinco minutos acesa, enquanto o composto blue formazana foi produzido pela fotoreação do NBT, e nas amostras com atividade observou-se que a reação fica mais clara que o branco do claro. A medida foi realizada em espectrofotômetro a 560nm.

3.8.7. Peroxidação lipídica

Para determinação da peroxidação lipídica foram utilizados 200mg de material vegetal por amostra. A cada amostra depois de macerada em nitrogênio líquido, foram acrescidos 1,3ml (1/4,5) de ácido tricloroacético (0,1%), com aproximadamente 20% de PVPP. Após a homogeneização, 1,4ml foram transferidos para microtubos para serem centrifugados (Volume da amostra macerada + 1,3ml de ácido tricloroacético) a durante cinco minutos a 10000 rpm. Do material centrifugado retirou-se alíquota de 0,250ml do sobrenadante de cada amostra, onde foi adicionado 1ml de ácido tricloroacético (20%, contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico). A mistura foi mantida por 30 minutos em banho maria a 95°C. Ao serem retiradas do banho maria, as amostras sofreram um rápido resfriamento em gelo. Com o intuito de separar resíduos formados ao longo dos procedimentos, cerca de 1,4ml de cada amostra foram transferidos para um novo microtubo. Para clareamento da amostra foi realizada uma nova centrifugação por 10 minutos a 10000rpm.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600nm. A concentração de MDA, em nmol.g⁻¹ massa fresca, foi calculada de acordo com o coeficiente de extinção da reação:

$$\eta \text{mol MDA} = [(A_{535} - A_{600}) / 155000] * 10^6$$

$$\eta \text{mol MDA. g}^{-1} \text{MF} = (\eta \text{mol MDA}) / 0,3$$

3.8.8. Quantificação de peróxido de hidrogênio

A quantificação de peróxido de hidrogênio foi realizada segundo Alexieva et al. (2001). As amostras frescas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com a adição de TCA 0,1% na relação de 100mg.mL⁻¹(m/v). O homogeneizado foi transferido para microtubos e centrifugados a 10000rpm por 15 minutos a 4°C. Para cada amostra foi reservado 200μL do sobrenadante, ao qual se adicionou 200μL de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,5) e 800μL de iodeto de potássio 1M. A reação foi deixada em gelo e permaneceu no escuro durante 60 minutos. Após o período em baixa temperatura a reação foi deixada durante 20 minutos em temperatura ambiente para estabilização. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro Perkin Elmer - Lambda 40 a 390nm e a quantidade de peróxido de hidrogênio expressa em μmol.g⁻¹massa fresca.

3.9. Análise estatística dos dados

Os métodos estatísticos rotineiros não são pertinentes aos dados obtidos para as análises histoquímicas e ultraestruturais (MEV) (HUTCHINSON; KRISHNARAJ; SAXENA, 1996).

Os resultados obtidos através das análises visuais morfológicas realizou-se uma análise descritiva, utilizando os dados de contagem transformados em percentuais.

Para análise bioquímica, foram obtidas três repetições independentes para MDA e Peróxido de hidrogênio, e três repetições independentes para análise de proteínas solúveis totais, e atividades da CAT, SOD e APX. Os dados quantitativos obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Os parâmetros, homogeneidade de variâncias e distribuição normal dos resíduos, foram verificados através do teste de Bartlett (BARTLETT, 1937) e Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965). Os resultados foram analisados utilizando o software Sisvar 5.6.

3.10. Resumo da metodologia

Para melhor compreensão da cronograma executado, da sequência dos processos, bem como das técnicas adotadas para realizar cada análise será apresentado a seguir um resumo esquemático de todo conteúdo da metodologia (Figura 5).

Figura 5. Resumo esquemático da metodologia apresentada

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de indução de calos

Serão exibidos nos resultados do teste de indução de calos os tratamentos responsivos, pois os demais não eram de interesse da pesquisa realizada.

4.1.1. Frequência de calos

Após trinta dias de cultivo, seis dos dezesseis tratamentos foram responsivos quanto a produção de calos. Dois tratamentos se destacaram neste primeiro período, sendo eles T06, representado por uma concentração de $0,5\text{mgL}^{-1}$ de 2,4-D e $0,1\text{mgL}^{-1}$ de BAP, e o tratamento T08, com uma concentração de $0,5\text{mgL}^{-1}$ de 2,4-D e $2,0\text{mgL}^{-1}$ de BAP. Ambos com aproximadamente 40% do material com formação de calo (Figura 6).

Figura 6. Gráfico de frequência de material responsivo e não responsivo por tratamento após 30 dias de cultivo

Assim como apresentado por Ferreira et al. (2007) em trabalho de indução da calogênese em explantes foliares de figueira, os melhores tratamentos foram aqueles os quais os explantes foram cultivados em presença de 2,4-D. Tal resultado também é condizente com os resultados obtidos por Berthouly e Michaux-Ferriere (1996), os mesmos verificaram a indução da calogênese em meios com concentrações elevadas de 2,4-D, bem como em baixas concentrações.

A ausência de resposta na formação de calos nos tratamentos T01, T05 e T13, está relacionado a ausência de citocinina no meio de cultura. A ausência de BAP acarretou a não resposta dos explantes, bem como encontrado por Ferreira et al. (2007), que em situação similar não obteve resposta em tratamentos os quais não possuíam uma fonte de citocinina, no caso dos autores o fitorregulador utilizado foi a cinetina.

O mesmo padrão de resposta foi mantido no final dos 60 dias de cultivo, ou seja, os mesmos tratamentos permaneceram com a mesma indução da calogênese (Figura 7). Este padrão linear de resposta deve-se principalmente ao grau de oxidação que os explantes passam na cultura *in vitro*, principalmente devido ao processo de assepsia. Outro ponto importante, para a não observação de uma maior quantidade de material responsivo ao longo do tempo, é a quantidade de contaminação por fungos ao longo dos dois cultivos, sendo este fato o maior ocasionador de perda de material ao longo do teste de indução.

Figura 7. Gráfico de frequência de material responsivo e não responsivo por tratamento após 60 dias de cultivo

No final do cultivo as melhores respostas quanto a frequência de material embriogênico foram de fato os tratamentos T06 e T08. O fato desses tratamentos terem se destacado está coerente quando comparado às respostas encontradas por Ferreira et al. (2007). Em trabalho, os autores verificaram que os melhores tratamentos em ganho de massa fresca das estruturas calosas foram àqueles em que as concentrações de citocinina são superiores às concentrações de auxina.

Segundo a afirmação de Filho (1995), as espécies de grande porte requerem alta concentração de reguladores de crescimento para formação de calos. Vê-se indispensável para o sucesso na indução de calos a presença de auxinas e citocininas, uma vez que, as auxinas favorecem o processo de divisão celular, crescimento e alongamento (TAIZ; ZEIGER, 2004), e as citocininas auxiliam na divisão celular resultando na produção de calos embriogênicos (PASQUAL, 2001).

4.1.2. Cobertura por calos

Entre os tratamentos responsivos, àqueles que apresentaram formação de calos, foi verificado o quanto de calo que cada um destes tratamentos produziram no final dos 60 dias de cultivos. Esta quantidade de calo foi estimada de acordo com área superficial de cada explante responsivo coberta por estrutura calosa.

No tratamento T06 cerca de um terço do material responsivo foi verificado com cerca de 50% dos explantes cobertos com calo (Figura 8), sendo esta, uma resposta satisfatória pelo período de tempo de indução.

Sendo que os explantes responsivos representados pela coluna 0% são aqueles os quais houve uma pequena formação de estrutura calosa cuja área de ocupação da superfície não chegou a 25%.

Figura 8. Gráfico de cobertura de calo por explante responsivo no tratamento T06, o qual verificou-se três explantes com uma cobertura inferior 25% da área foliar do explante inicial.

Já o tratamento T08, mesmo com uma quantidade expressiva de material responsivo, apresentou um padrão de cobertura menor por explante (T08). Sendo que, os explantes com 0% de cobertura apresentados nos gráficos representam uma produção de calos, porém com uma cobertura quase imperceptível quanto a área total do explante (Figura 9).

Figura 9. Gráfico de cobertura de calo por explante responsivo no tratamento T08

O tratamento T09 apresentou resposta quase imperceptível para o material responsivo, sendo representado por apenas dois explantes com cobertura de 25% (Figura 10).

Figura 10. Gráfico de cobertura de calo por explante responsivo no tratamento 09

Seguido do tratamento T08, o tratamento T10 também apresentou um resultado promissor. Ao longo dos 60 dias de cultivos todos os explantes as quais produziram calos estavam com uma cobertura de calo acima de 25% da área total do explante (Figura 11).

Figura 11. Gráfico de cobertura de calo por explante responsivo no tratamento 10

Por fim, o tratamento T12, que assim como o T09 teve uma pequena resposta quanto ao número de explantes responsivos, e mesmo àqueles que apresentaram produção de calos, foram em uma quantidade pequena, próxima a 25% de cobertura (Figura 12).

Figura 12. Gráfico de cobertura de calo por explante responsivo no tratamento 12

No item anterior (4.1.1) foi considerado que o tratamento T16 também teve resposta quanto a presença de material responsivo. Porém apresentavam pouca resposta quanto à cobertura e foram usados então para teste e ajustes para modificação do protocolo de histoquímica do Aceto Carmim.

Todo o período de indução da calogênese foi desenvolvido na ausência de luz. Trabalhos como o apresentado por Nogueira et al. (2007) comprovam que o melhor desenvolvimento de calos ocorre no escuro, independente de espécie. Contudo, esse período de indução no escuro pode se estender conforme curva de crescimento dos calos. Em estudos de curvas de crescimento existe uma fase denominada Linear, fase esta, na qual os calos diminuem a divisão celular e ocorre uma desaceleração do desenvolvimento dos mesmos. Segundo Mesquita et al. (2002) essa estagnação ocorre entre os 63 e 77 dias de cultivo em lichieira. Já em estudo com a espécie murici-pequeno Nogueira et al. (2008) determinou que a fase de desaceleração ocorre entre 60 e 80 dias de cultivo. Os valores apresentados podem indicar que a fase de estagnação dos calos de teca não tenha sido atingida, sendo necessário um maior tempo de cultivo para então se estabelecer uma curva de crescimento.

Em geral, mesmo alguns tratamentos se sobressaindo em relação aos demais, como foram os casos do T06 e T08, as respostas de formação de calos bem como o crescimento dos mesmos foram discretos quando comparados à indução da calogênese em outras espécies. Mais uma vez a condição de luminosidade pode ter sido fundamental para a resposta encontrada. Segundo Carneiro et al. (2012), em trabalho realizado com sisal, obteve 100% de formação de calos quando os explantes foram cultivados nos meios que continham apenas 2,4-D, ou apenas BAP, ou 2,4-D associado com BAP na presença de luz.

4.1.3. Oxidação

A oxidação está relacionada à resposta do material biológico à alguma fonte de estresse. E, assim como já apresentado, está relacionado com o processo de desdiferenciação das células somáticas. Logo, os tratamentos que apresentaram menor grau de oxidação tendem a ter um menor padrão de resposta quanto à produção de calos, como o observado nos tratamentos T03, T04 e T05 (Figura 13).

Figura 13. Porcentagem dos explantes oxidados, por tratamento, no final de 30 dias de cultivo

Além disso, como apresentado abaixo (Figura 14) o processo de oxidação tende a se tornar mais severo ao longo dos dias de cultivo. É possível observar que após 60 dias de cultivo, tratamentos que ainda não tinham todos os explantes com severo grau de oxidação, apresentaram uma maior quantidade de explantes oxidados, como é o caso do tratamento T04.

Figura 14. Porcentagem dos explantes oxidados, por tratamento, no final de 60 dias de cultivo

O controle da oxidação se tornou um desafio nas técnicas de propagação *in vitro* (PREECE; COMPTON, 1991). Em espécies lenhosas utilizadas na cultura de tecidos, os fenóis, flavonóides e taninos são as substâncias oxidantes mais comumente encontradas (PAIVA; PAIVA, 2001), principalmente em tecidos arbóreos tropicais (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998). Além da presença destes compostos, outros fatores podem interferir na produção de compostos fenólicos, são eles: idade e fase de desenvolvimento dos explantes (PAIVA; PAIVA, 2001).

Há alguns anos medidas são tomadas para evitar a oxidação de explantes, como a imersão em soluções antioxidantes de ácido cítrico, ou ácido ascórbico antes da inoculação, bem como a adição de carvão ativado, ácido ascórbico ou polivinilpirrolidone (PVP) ao meio de cultura (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998; PAIVA; PAIVA, 2001).

Werner (2009), encontrou que nem mesmo a utilização de antioxidantes e a ausência de luz foram eficientes no controle do processo degenerativo dos calos de pau brasil. No mesmo trabalho o autor demonstrou que o uso de carvão ativado foi favorável ao controle da oxidação. Contudo neste mesmo tratamento os explantes não apresentaram desenvolvimento de calos. No entanto, foi na presença de ácido ascórbico no escuro, que ocorreu maior ocorrência de calos, com 85% dos explantes apresentado resposta. Desta forma, fica evidente a necessidade de novos experimentos na condução da organogênese *in vitro* de teca relacionados ao controle de oxidação dos tecidos vegetais.

4.1.4. Análise morfológica e histoquímica

Seguido das avaliações quanto a produção de calos, foi necessário realizar testes histoquímicos com Aceto Carmim para verificar o quanto de material embriogênico tinha em cada tratamento responsivo. Sendo considerado linhagens celulares embriogênicas aquelas células que apresentaram coloração vermelha durante os testes histoquímicos.

Seguindo a mesma sequência de apresentação do item anterior, o tratamento T06, embora tivesse apresentado uma boa produção de calos, estes eram pequenos maciços de coloração clara entre o amarelo e marrom, o que é característico de calos não embriogênicos. Este fato foi confirmado após o teste histoquímico, uma vez que, as células não responderam à ação do corante usado, representando assim, células não embriogênicas (Figura 15).

Figura 15. Imagem à direita representa a morfologia externa de calo do tratamento T06. Fotomicrografia à direita apresenta células não embriogênicas, sem reação ao corante Carmim, sob indução do tratamento T06

O oposto foi observado no tratamento T08 (Figura 16). Este tratamento se mostrou responsivo quanto à produção de calos, sendo estes de aspecto mais friável, de coloração mais clara, entre o branco ao amarelo escuro. Depois da realização de teste histoquímico foi possível observar que quase 100% do material era constituído de células embriogênicas em coloração vermelha, apresentando massas de células pró embriogências (MPE).

Figura 16. Imagem à direita representa a morfologia externa de calo do tratamento T08. Fotomicrografia à direita apresenta células embriogênicas em coloração vermelha sob indução do tratamento T08. As setas em amarelo sinalizam as MPE encontradas no tecido

Seguindo um padrão de resposta similar ao tratamento T06, o tratamento T09, embora tivesse uma menor produção de calos, apresentou pequenas estruturas calogênicas representados por um material biológico gelatinoso e de coloração clara, e que após o teste histoquímico também apresentou baixa quantidade de células embriogênicas (Figura 17).

Figura 17. Imagem à direita representa a morfologia externa de calo do tratamento T09. Fotomicrografia à direita apresenta células não embriogênicas em coloração escura, devido a pouca afinidade com o corante Aceto Carmim.

Também houve coincidência no padrão de resposta entre os tratamentos T08, já apresentado, e o tratamento T10. Os dois tratamentos apresentaram calos de coloração amarela claro, com textura macia, com células embriogênicas como verificado nos testes histoquímicos (Figura 18). Contudo, T10 teve uma menor quantidade de

explantes cobertos por calo, além da afinidade do tecido responsivo com o corante utilizado apresentar menos intensidade, deixando T08 como melhor resposta a produção de calos embriogênicos.

Figura 18. Imagem à direita representa a morfologia externa de calo do tratamento T10. Fotomicrografia à direita apresenta células embriogênicas em coloração vermelha escuro, indicada por uma região mais externa do calo, como sinaliza a seta amarela

Com uma resposta mediana, no tratamento T12 (Figura 19), foi observado calos com aspectos morfológicos característicos de material embriogênico, maciços de células friáveis de coloração branca a amarelo claro, o que pode ser confirmado com o teste histoquímico. Contudo a quantidade de calo produzido nos explantes era muito abaixo de outros tratamentos já citados acima (T08 e T10).

Figura 19. Imagem à direita representa a morfologia externa de calo do tratamento T12. Fotomicrografia à direita apresenta células embriogênicas em coloração vermelha. As setas em amarelo indicam as zonas onde se encontram as MPE.

Lopes et al. (2016) observou que todos os calos de pitaia vermelha, com aspectos friáveis, apresentaram reação positiva ao Carmim acético, confirmando o seu potencial embriogênico. Para Steiner et al. (2005), a reação positiva ao Carmim acético está associada à competência da célula para o desenvolvimento celular.

4.2. Análise de microscopia eletrônica de varredura

A análise ultraestrutural é uma ferramenta muito importante em pesquisas relacionadas à cultura de tecidos. Através da microscopia eletrônica de varredura é possível estudar importantes aspectos relacionados à organogênese vegetal.

Durante o estudo da calogênese em explantes foliares de teca, foi possível verificar as diferenças entre o tratamento mais responsivo e o menos responsivo quanto à formação de estruturas embriogênicas. A análise que foi aplicada durante três fases do desenvolvimento de calos permitiu averiguar o padrão de divisão celular, bem como as características externas das células durante todo o processo de indução, possibilitando o cruzamento dos dados fornecidos pela análise histoquímica junto aos aspectos visuais morfológicos.

O calos produzidos em meio de cultura MS suplementados com $0,5\text{mgL}^{-1}$ de 2,4-D e $0,1\text{ mgL}^{-1}$ de BAP, tratamento 06, eram caracterizados por pequenas estruturas de crescimento desuniformes, com coloração amarronzadas. A textura dos tecidos eram rígidas, características estas que permitiam inferir que se tratava de calos não embriogênicos.

Com a análise da microscopia eletrônica de varredura foi possível verificar o aspecto dos calos referentes ao tratamento T06 aos 40 dias de cultivo, bem como as características das células na estrutura dos calos aos 20, 40 e 60 dias de cultivo (Figura 20).

Figura 20. Calo não embriogênico aos 40 dias de cultivo em meio de cultura MS acrescido de $0,5\text{mgL}^{-1}$ de 2,4-D e $0,1\text{ mgL}^{-1}$ de BAP, com estrutura rígida, tendo a superfície caracterizada por células mortas, ou vestígios de células originais do explante foliar (A); Células alongadas, provenientes de calos com 20 dias de cultivo, sinalizadas pela seta verde, característica de tecido não embriogênico, apresentando divisão celular irregular (B); Conjunto de células apresenta em calos com 40 dias de cultivo, células com maior dimensão, contudo sem potencial embriogênico (C); Células aos 60 dias de cultivos, apresenta divisão irregular e diferentes características celulares, como células alongadas e isodiamétricas (D)

A presença de células isodiamétricas no final do cultivo, aos 60 dias, confirma a necessidade de se estabelecer curvas de crescimento durante a calogênese quando a indução é realizada pelo uso do 2,4-D e BAP em explantes foliares de teca. Os calos provenientes do cultivo em tratamento T06 poderia, então, ter tido resposta embriogênica caso os cultivos tivessem maior duração, ou caso fosse realizado algum ajuste na metodologia de cultivo, como a presença de luz durante a fase de indução.

Assim como encontrado por Carvalho et al. (2013), em estudo sobre a indução de calo em explantes de folhas cotiledonares de maracujazeiro, a combinação do uso de picloram com uma fonte exógena de citocinina, a cinetina, pode não favorecer o processo embriogênico, resultando em células grandes, com espaço intercelular e de formato irregular. No mesmo estudo, os autores verificaram que o uso da auxina 2,4-D em conjunto com a cinetina resultaram em calos com células pequenas, disposição compacta e pouco espaço intercelular, indo contra o resultado obtido nos calos de teca provenientes do tratamento T06. Tal fato evidencia a importância de se estabelecer equilíbrios ótimos entre as fontes exógenas de fitorreguladores, bem como a necessidade de testar diferentes reguladores de crescimento.

De encontro com a resposta encontrada anteriormente, os calos provenientes do tratamento T08 apresentaram características embriogênicas, assim como já citado nas análises histoquímicas. A microscopia eletrônica de varredura permitiu confirmar os resultados obtidos na análise com corante Carmim acético.

As micrografias realizadas dos calos originados em explantes foliares de teca em meio de cultura MS com adição de $0,5\text{mgL}^{-1}$ de 2,4-D e $2,0\text{mgL}^{-1}$ de BAP, tratamento T08, permitiu a visualização dos calos aos 40 dias de cultivo, bem como o caracterização das células componentes do calos aos 20, 40 e 60 dias de cultivo (Figura 21). O tratamento 08 possibilitou a produção de calos embriogênicos com morfologia externa caracterizada por uma coloração clara, entre branco e amarelo claro, e uma estrutura friável.

Figura 21. Micrografia de calo produzido em meio de cultura MS com adição de $0,5\text{mgL}^{-1}$ de 2,4-D e $2,0\text{mgL}^{-1}$ de BAP, aos 40 dias de cultivo, possibilitando visualizar a presença de agregados celulares, com células isodiamétricas e pouco espaço intercelular (A); Conjunto de células agregadas, com características embriogênicas em calo aos 20 dias de cultivo (B); Micrografia ampliada de um agregado celular, com características embriogênicas de um calo aos 40 dias de cultivo (C); Calo apresentando perda de potencial embriogênico, apresentando células isodiamétricas bem como alongadas, calo aos 60 dias de cultivo (D)

O formato isodiamétrico das células é característico de células meristemáticas, e os calos embriogênicos são compostos por esta linhagem celular, com dimensões pequenas e com citoplasma denso (NOGUEIRA et al., 2007). Enquanto células alongadas apresentam vacuolização, sendo este, um dos primeiros sinais de morte celular acompanhado da ruptura de suas membranas (FILANOVA et al., 2000).

As massas pró embriogênicas, também observadas nos calos do tratamento T08, são aglomerados celulares capazes de produzir embriões somáticos e possuem como característica células de tamanhos reduzidos e citoplasma denso (FILANOVA, et al., 2000).

A microscopia eletrônica de varredura possibilitou ressaltar, mais um vez, a importância de se estabelecer curvas de crescimento em estudos de indução de calos. Pois fica perceptível que, aos 60 dias de cultivo o tratamento 06 possibilitou a formação de estruturas pró embriogênicas nos calos, enquanto o tratamento T08 acarretou a perda de pontencial embriogênico neste mesmo período.

A melhor resposta encontrada no tratamento T08 pode ser justificada devido ao aumento da presença de citocinina em relação a auxina, promovendo a expressão da embriogênese somática. Segundo Guerra et al. (1999), o processo de conversão de calos embriogênicos em embriões ocorre em função de repetidos ciclos em meio de cultura o qual promove a divisão celular. Isto significa, que após estabelecido, o tratamento T08 é o melhor indutor de células embriogênicas. O próximo passo seria realizar estudos para desenvolver um meio de cultura de multiplicação dessa linhagem celular.

4.3. Análise bioquímica

Os processos de diferenciação e divisão celular, responsáveis pela morfogênese vegetal, são desencadeados sobre a influência de sinais que acarretam alterações bioquímicas e metabólicas diversas. Algumas alterações bioquímicas são indicadas para discriminar tecidos embriogênicos e não embriogênicos (NIEVES et al., 2003), bem como culturas as quais possuem, ou não, potencial de regeneração (LAUKKANEN et al., 1999; BONFILL et al., 2003).

No cultivo *in vitro* o suprimento com fontes exógenas de reguladores de crescimento e o acúmulo de substâncias tóxicas (GASPAR et al., 2002), estão entre os fatores indutores de estresse que desencadeiam a produção de espécies reativas de oxigênio e ao desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes e pré-oxidantes.

Contudo, as células vegetais possuem sistemas bem desenvolvidos para regular o nível das espécies reativas de oxigênio, e a concentração dessas moléculas quimicamente ativas pode sofrer alterações pela ação de enzimas, as quais são bastante sensíveis às condições de estresse (MITTLER, 2002).

4.3.1. Determinação de proteínas

A quantificação de proteínas solúveis totais permitiu verificar diferenças estatísticas entre os tratamentos T06 e T08, bem como os níveis encontrados nas plantas matrizes e também no material após o procedimento de desinfestação (Tabela 3).

Tabela 3. Quantificação de proteínas totais solúveis dos tratamentos, T06 e T08, aos 40 dias de cultivo, bem como os níveis de proteínas nas plantas matrizes e nos explantes após o processo de desinfestação, expressos em mg de proteína por ml

Tratamentos	Proteínas		Resultados do teste
	Média	Unidade	
Planta	1,42	mg/ml	1,42d
Após desinfestação	0,03	mg/ml	0,03a
T06 (40 dias)	0,35	mg/ml	0,35b
T08 (40 dias)	0,64	mg/ml	0,64c

Em trabalho realizado por Nascimento (2009), na indução da calogênese em pupunha, o autor verificou que os calos com respostas embriogênicas tinham estatisticamente menores quantidades de proteína quando comparados aos calos sem resposta embriogênica.

O fato do presente trabalho com calos de teca ter apresentado resposta inversa ao encontrado nos estudos com pupunha pode ser explicado pela diversidade de proteínas encontradas em cada um dos materiais. Isto é,

a baixa presença de proteínas nos explantes após a desinfestação se deve ao grande estresse sofrido nos tecidos, levando grande parte do explante à morte celular. Já os altos níveis de proteínas encontradas nas plantas matrizes estão relacionados à quantidade de genes sendo expressos para realizar todos os comandos vitais das plantas. O tratamento T06 apresentou nível de proteínas inferior ao tratamento T08, ou seja, a indução da embriogênese no tecido dos explantes estimulam uma produção maior de proteínas. Steeinmacher (2005), trabalhando na indução da embriogênese somática em pupunha, mostrou que os calos embriogênicos além de bons níveis de proteína solúveis apresentam uma maior diversidade das mesmas.

4.3.2. Atividade da Catalase (CAT)

A catalase tem função de quebrar o peróxido de hidrogênio, resultando em água e oxigênio estável. É a única entre as enzimas degradantes de peróxido de hidrogênio que não consome equivalentes redutores da célula e que possui mecanismo muito eficiente para a remoção do peróxido de hidrogênio formado sob condições de estresse (MALLICK; MOHN, 2000).

Os resultados da atividade da CAT em espectrofotômetro mostraram que em nenhum momento do processo de indução houve diferença estatística no processo de indução. Ou seja, os explantes foliares apresentaram os mesmos níveis de atividade da CAT desde a coleta nas plantas matrizes, até o resultado final nos calos resultantes dos 40 dias de cultivo no tratamento T06 e T08 (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade da CAT nos tratamentos, T06 e T08, aos 40 dias de cultivo, bem como nas plantas matrizes e nos explantes após o processo de desinfestação, expressos em $\mu\text{mol}/\text{mgprot}$

Catalase			
Tratamentos	Média	Unidade	Resultados do teste
Planta	13,08	$\mu\text{mol}/\text{mgprot}$	13,08a
Após desinfestação	30,94	$\mu\text{mol}/\text{mgprot}$	30,94a
T06 (40 dias)	39,55	$\mu\text{mol}/\text{mgprot}$	39,55a
T08 (40 dias)	46,03	$\mu\text{mol}/\text{mgprot}$	46,03a

A atividade da catalase foi considerada baixa em todas as amostras e tratamentos estudados. Tal atividade encontrada tanto em T06 quanto T08 pode estar relacionada ao estágio inicial da embriogênese. Resultados semelhantes foram encontrados por Blasquez et al. (2009), quando o autor trabalhou com embriogênese somática de *Crocus sativus* L. induzida com 2,4-D e BAP.

A baixa atividade da enzima catalase também precedeu o surgimento de embriões somáticos em *Lycium barbarum* L. (CUI et al., 1999) e *Gladiolus hybridus* (GRUPTA; DATTA, 2004).

Segundo Arora et al. (2002), a concentração de enzimas catalase nos peroxissomos não são eficientes na degradação de baixas concentrações de peróxido de hidrogênio, pois essas moléculas são reduzidas no ciclo do ascorbato-glutationa, sob a ação da ascorbato peroxidase (APX) e outras enzimas do ciclo. Logo, a atuação da catalase é muito importante quando a concentração de peróxido está em níveis muito elevados, isto é, estresse severo.

4.3.3. Atividade da Ascorbato peroxidase (APX)

Os resultados da atividade da Ascorbato peroxidase se mostraram inferiores aos resultados da enzima catalase. Contudo, foi possível averiguar que durante a fase de adaptação dos explantes à cultura *in vitro*, após desinfestação, a APX teve uma atividade estatisticamente superior (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade da APX nos tratamentos, T06 e T08, aos 40 dias de cultivo, bem como nas plantas matrizes e nos explantes após o processo de desinfestação, expressos em $\mu\text{mol}/\text{mgprot}$

Ascorbato Peroxidase			
Tratamentos	Média	Unidade	Resultados do teste
Planta	0,06	$\mu\text{mol}/\text{mgprot}$	0,06a
Após desinfestação	4,64	$\mu\text{mol}/\text{mgprot}$	4,64b
T06 (40 dias)	0,51	$\mu\text{mol}/\text{mgprot}$	0,51a
T08 (40 dias)	0,25	$\mu\text{mol}/\text{mgprot}$	0,25a

A baixa atividade da Ascorbato peroxidase e da Catalase estão relacionadas com o acúmulo do peróxido de hidrogênio presentes nas células.

Cui et al. (1999) apontaram que a atividade das Peroxidases e da Catalase decaíram rapidamente nos primeiros dias da diferenciação celular, indicando que um aumento intracelular de peróxido de hidrogênio foi determinante na formação de células embriogênicas. Os autores ainda encontraram que a embriogênese somática em *Lycium barbarum* L. foi estimulada pela adição de 200mM de peróxido de hidrogênio ao meio de diferenciação.

4.3.4. Atividade da Superóxido dismutase - SOD

Segundo os dados obtidos da atividade da Superóxido dismutase, todos os tratamentos avaliados se diferiram estatisticamente, tendo uma alta correlação com os níveis de estresse ao longo do processo de indução da embriogênese somática (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade da SOD nos tratamentos, T06 e T08, aos 40 dias de cultivo, bem como nas plantas matrizes e nos explantes após o processo de desinfestação, expressos em UnidadeSOD/mgprot

Superóxido Dismutase			
Tratamentos	Média	Unidade	Resultados do teste
Planta	55,88	UnidadeSOD/mgprot	55,88a
Após desinfestação	2684,92	UnidadeSOD/mgprot	2684,92d
T06 (40 dias)	198,93	UnidadeSOD/mgprot	198,93c
T08 (40 dias)	110,92	UnidadeSOD/mgprot	110,92b

Segundo Dewir et al. (2006), as plantas possuem um complexo sistema antioxidativo constituído por enzimas e metabólitos antioxidativos que podem ser capazes de prevenir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Assim como apresentado por Nunes et al. (2015), em estudo de indução de calos em gérbera, verificou-se que a atividade da Superóxido dismutase está ligada ao crescimento, friabilidade e coloração dos calos. O crescimento

de células e calos na cultura de tecidos ocorre de maneira acelerada, o que gera uma maior concentração de radicais livres estimulando a síntese de enzimas antioxidantes, as quais têm a dupla finalidade de desintoxicação e fornecer moléculas para biossíntese celular. Todavia, isto poderia levar a um desequilíbrio celular favorecendo o escurecimento dos calos pela formação e ação de compostos fenólicos.

De fato, após o agressivo estresse favorecido pelo processo de desinfestação, há um aumento significativo na atividade da SOD, permitindo que os explantes foliares de teca ficassem automaticamente com aspecto vítreo e coloração marrom. Contudo, após o período de desinfestação, ambos tratamento T06 e T08 apresentaram decréscimo significativo na atividade da SOD. Tal decréscimo também é relatado por Blazquez et al. (2009), em cultura de *Crocus sativus* L., onde os autores sugerem que o decréscimo progressivo da atividade da SOD está relacionado com os estágios de desenvolvimento de embriões somáticos.

Embora aos 40 dias de cultivo os calos originados pelo tratamento T06 não tenham demonstrado potencial embriogênico, a diferença estatística, ainda que pequena, comparada à atividade da SOD no T08, pode-se inferir um futuro ganho de potencial embriogênico pelos calos de T06, uma vez que a atividade da SOD pode diminuir ao longo do tempo. O ganho de potencial embriogênico de T06 pode ser notado nas análises ultraestruturais aos 60 dias de cultivo.

4.3.5. Peroxidação lipídica

O estresse oxidativo também pode ser verificado pela quantificação do produto resultante do ataque do peróxido de hidrogênio aos lipídeos de membrana, o que resulta como principal produto o malondialdeído (MDA) (DEWIR et al., 2006), ou seja, quanto mais a produção de MDA, maior a possibilidade de estar ocorrendo um expressivo nível de estresse oxidativo nas células.

Dentre as amostras analisadas, aquela retirada das matrizes no dia da reintrodução apresentou uma maior produção de MDA estatisticamente quando comparada as demais amostras que obtiveram os mesmos níveis de produção da molécula (Tabela 7).

Tabela 7. Quantificação de MDA nos tratamentos, T06 e T08, aos 40 dias de cultivo, bem como nas plantas matrizes e nos explantes após o processo de desinfestação, expressos em $\eta\text{mol/gmatfresc}$

Malondialdeído			
Tratamentos	Média	Unidade	Resultados do teste
Planta	72,43	$\eta\text{mol/gmatfresc}$	72,43b
Após desinfestação	30,54	$\eta\text{mol/gmatfresc}$	30,54a
T06 (40 dias)	14,54	$\eta\text{mol/gmatfresc}$	14,54a
T08 (40 dias)	29,76	$\eta\text{mol/gmatfresc}$	29,76a

Levando em consideração a hipótese que, quanto maior a quantidade de MDA, maior o estresse oxidativo, é possível inferir que as plantas matrizes sofreram maior estresse quando comparadas ao período de cultivo *in vitro* dos explantes foliares.

As matrizes as quais davam origem aos explantes estavam sob condições de viveiro, ou seja, embora fossem fornecidos um aporte de água e nutrientes, as mesmas estavam sob influência de luminosidade não

controlada, temperatura não controlada, bem como dispostas para sofrer influências de fatores bióticos, como pragas, doenças e competição interespecífica. Todas essas fontes podem acarretar no estresse das plantas matrizes.

Adicionado ao fato dos tratamentos *in vitro* apresentarem menor estresse oxidativo, estes se encontravam em condições controladas de ambiente. Um fato muito importante a ser considerado, é a presença de reguladores de crescimento do grupo citocinina adicionados ao meio de cultura, substâncias estas, que podem agir como antioxidantes não enzimáticos (MÝTINOVA et al., 2010).

4.3.6. Quantificação de peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio age em dupla rota nos vegetais: em baixas concentrações, atua como um mensageiro molecular envolvido na sinalização adaptativa, disparando a tolerância a vários estresses abióticos e, em altas concentrações, promove a morte celular programada (DAT, et al., 2000; KARPINSKI, et al., 1999).

A quantificação do peróxido nos explantes foliares de teca, ao longo do processo de indução da embriogênese somática, evidenciou estresse sofrido pelas plantas matrizes, e uma diminuição significativa dos níveis de peróxido após a introdução do material na cultura *in vitro* (Tabela 8).

Tabela 8. Quantificação de peróxido de hidrogênio nos tratamentos, T06 e T08, aos 40 dias de cultivo, bem como nas plantas matrizes e nos explantes após o processo de desinfestação, expressos em $\mu\text{mol/gmatfresc}$

Tratamentos	Peróxido de Hidrogênio		Resultados do teste
	Média	Unidade	
Planta	25116,66	$\mu\text{mol/gmatfresc}$	25116,66b
Após desinfestação	1441,17	$\mu\text{mol/gmatfresc}$	1441,17a
T06 (40 dias)	219,33	$\mu\text{mol/gmatfresc}$	219,33a
T08 (40 dias)	182,02	$\mu\text{mol/gmatfresc}$	182,02a

Assim, como citado na quantificação de MDA, a superioridade, inclusive estatística, do estresse encontrado nas plantas matrizes se deve principalmente ao fator ambiental.

Contudo, o declínio na concentração do peróxido nos tratamentos T06 e T08, podem ser benéficas ao processo de multiplicação por meio da cultura de tecidos. Carvalho et al. (2009) sugerem que em níveis baixos, o peróxido de hidrogênio pode atuar como um estímulo na morfogênese vegetal, perdendo sua capacidade tóxica. Os autores ainda citam a importância da molécula nas células vegetais como um possível intermediário entre o estresse oxidativo e a regeneração de plantas na cultura de tecidos.

5. CONCLUSÕES

Os tratamentos com auxina 2,4-D e a citocinina BAP mostraram potencial para cultivo *in vitro* de explantes foliares de teca. Sendo o tratamento T08 representado pela adição de $0,5\text{mgL}^{-1}$ de 2,4-D e $2,0\text{ mgL}^{-1}$ de BAP ao meio MS, o tratamento mais responsivo para obtenção de calos embriogênicos. Como discutido no trabalho, fica como possível opção de estudo futuro, o uso de concentrações mais elevadas dos reguladores testados, mantendo a relação auxina/citocinina do tratamento T08.

Toda a fase de indução da calogênese em teca, foi realizada no escuro. Contudo, o material poderia apresentar melhores respostas se exposto à um período luminoso durante o cultivo *in vitro*. Além disso, teve-se como resposta diferentes padrões de resposta da calogênese de acordo com o tempo de cultivo e a proporção dos reguladores de crescimento testados. É importante reforçar a necessidade de se estabelecer curvas de crescimento em estudos envolvendo calos, pois como foi notado entre os tratamentos T08 e T06, cada tratamento responde positivamente à embriogênese somática em tempos de cultivo diferentes.

A técnica da desinfestação para introdução de material *in vitro* é muito danosa aos tecidos vegetais, acarretando em dificuldades de resposta morfogênicas nos tecidos, devido ao estresse oxidativo. Torna-se importante, então, o uso de substâncias antioxidantes na fase de introdução da cultura, como por exemplo o ácido ascórbico.

O uso das ferramentas de histoquímica e microscopia eletrônica de varredura se mostraram importantes no diagnóstico correto para diferenciar material responsivo e não responsivo, quando se trata de indentificar linhagem de células embriogênicas em calos de teca. Foi através da MEV que encontrou-se aglomerados de células pró embriogênicas em calos provenientes do tratamento T08, confirmando os resultados obtidos pela análise histoquímica com o uso do corante Carmim acético.

Através das análises bioquímicas foi possível verificar ótimos resultados para enzima SOD, como um marcador de estresse oxidativo relacionado às respostas morfogênicas. Além disso, a quantificação do MDA e peróxido de hidrogênio, deixou claro que estas moléculas quando em pequenas quantidades proporcionam um efeito positivo na resposta morfogênica. A bioquímica ainda caracterizou a qualidade fisiológica das matrizes usadas como fonte de coleta dos explantes foliares. Para ensaios futuros será de grande importância selecionar matrizes de acordo com características visuais, bem como bioquímicas.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. de. Clonagem e doenças do eucalipto. 2 Ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2009. 500 p.
- ANDRADE, W. F. Indução do rejuvenescimento de teca (*Tectona grandis* L. f) através de enxertia seriada e micropropagação. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Low temperature and oxidative stress. *Current Science*, V.82, P.1227-1238, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS – ABRAF. Anuário estatístico da ABRAF 2008 ano base 2007. Brasília: ABRAF, 2008. 87 p.
- BAILEY-SERRES, J.; MITTLER R. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology*, Washington, v. 141, p. 311, 2006. DOI /10.1104/pp.104.900191.
- BAILLÉRES, H.; DURAND, P.Y. Non-destructive techniques for wood quality assessment of plantation grown teak. *Bois et Forêts des Tropiques*, Nogent-sur-Marne, v. 263, n. 1, p. 17-29, 2000.
- BARROSO, D. G. et al. Diagnóstico de deficiência de macronutrientes em mudas de teca. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 671- 679, 2005.
- BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society of London*, London, v. 160, p. 268-282, 1937.
- BECRAFT, P. W. Receptor kinases in plant development. *Trends in plant science*, v. 3, n. 10, p. 384-388, 1998.
- BERTHOULY M, MICHAUX-FERRIERE NM (1996) High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44:169-176,
- BHAT, K.M.; PRIYA, P.B.; RUGMINI, P. Characterisation of juvenile wood in teak. *Wood Science and Technology*, New York, v. 34, n. 6, p. 517-532, 2001.
- BLAZQUEZ, S.; OLMOS, E.; HERNÁNDEZ, J.A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; FERNÁNDEZ, J.A.; PIQUERAS, A. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 97, p. 49-57, 2009.

- BONFILL, M.; CUSIDO, R.M.; PALAZON, J.; CANUT, E.; PINOL, M.; MORALES, C. Relationship between peroxidase activity and organogenesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.73, p.37-41, 2003.
- BOWLER, C.; SLOOTEN, L.; VANDENBRANDEN, S.; DERYCKE, R.; BOTTERMAN, J.; SYBESMA, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Manganese superoxide-dismutase can reduce cellular-damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO Journal*, Oxford, v. 10, p. 1723-1732, 1991.
- BONGA, J.M. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). *Tissue culture in forestry*. Boston: Martinus Nijhoff, Dr W Junk Publishers, 1993. p.387-412.
- Bonga JM (2016) Conifer clonal propagation in tree improvement programs: Vegetative propagation of forest trees (ed. by YS Park, JM Bonga & HK Moon) National Institute of Forest Science, Seoul, Korea, pp. 3–31.
- BOUTILIER, K. et al. Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *The Plant Cell Online*, v. 14, n. 8, p. 1737-1749, 2002.
- Bozhkov PV, Filonova LH & von Arnold S (2002) A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by a withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. *Biotechnology and Bioengineering* 77: 658–667.
- BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1189-1197.
- CÁCERES FLORESTAL. Manual do cultivo da teca, 2006. Disponível em: <http://www.caceresflorestal.com.br/Manual_do_cultivo_da_teca-Caceres_Florestal.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2016.
- CAMINO, R.; MORALES, J. P. Las plantaciones de teca en América Latina: mitos y realidades. Turrialba: CATIE, 2013. 392 p. (Série técnica: Informe técnico, 397).
- CARNEIRO, F. S. Indução de calos e organogênese indireta em sisal (*Agave sisalana* Perrine). 2012. 37 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) -Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.
- CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; CAMARA, T.R. Mecanismos antioxidantes associados à embriogênese somática. *Embrapa algodão. Documentos*, v.223, 25p, 2009.

- CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; CASTO, E. M.; PAIVA, P. D. O.; VARGAS, D. P. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. *Brazilian Journal of Botany*, v. 36, n. 2, p. 141-151, 2013.
- CASILLAS, V. J. C.; LONDOÑO, I. J.; GUERRERO, A. H.; BUITRAGO, G. L. A. Análisis cuantitativo de la aplicación de cuatro bioestimulantes en el cultivo del rabano (*Raphanus sativus* L.). *Acta Agronomica*, Palmira, v. 36, n. 2, p. 185-195, 1986.
- CASTRO, V.R. de. Aplicação de métodos não destrutivos na avaliação das propriedades físicas do lenho de árvores de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barr. et Golf. e *Tectona grandis* (L.f.). 2001. 104 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- CHALUPA, V. Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp.). In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J (ed) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 5, p. 31-43, 1999.
- CHMIELARZ, P. Somatic embryogenesis of *Quercus robur* L. and cryopreservation of somatic embryos in liquid nitrogen: Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem, 365. Fortschritte bei der Lagerungstechnologie von Eichensaatgut. Braunschweig. Parey Buchverlag Berlin, pp. 49-59, 1999.
- CUI, K.; XING, G.; LIU, X.; XING, G.; WANG, Y. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant science*, v. 146, p. 9-16, 1999.
- DAMIÃO FILHO CF (1995) *Cultura de tecidos de plantas: micropropagação*. Jaboticabal, FUNEP. 25 p.
- DAQUINTA, M.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; ESCALONA, M. Morfogénesis in vitro de teca (*Tectona grandis* L.). *Investigación agraria: Sistemas y recursos forestales*, Madrid, v. 11, n. 1, p. 137-144, 2002.
- DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Basel, v. 57, p. 779-795, 2000.
- DEWIR, Y.H; CHAKRABARTY, D.; ALI, M.B.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia milii* hyperhydric shoots. *Environmental and Experimental Botany*, Oxford, v. 58, p. 93-99, 2006.
- DIAS, R.M.S.L.; FRANCO, E.T.H.; DIAS, C.A. Enraizamento de estacas de diferentes diâmetros em *Platanus acerifolia* (Aiton) Willdenow. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v.9, n.2, p.127-136, 1999.

- ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In vitro Cell Dev Biol-Plant*, v. 99, p. 631-642, 2010.
- ELLIOTT, R. C. et al. AINTEGUMENTA, an APETALA2-like Gene of Arabidopsis with Pleiotropic Roles in Ovule Development and Floral Organ Growth. *The Plant Cell Online*, v. 8, n. 2, p. 155-168, 1996.
- EL OUAFAOUI, S. et al. Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant Molecular Biology*, v. 74, n. 4, pp. 313-326, 2010.
- ENTERS, T. Site, tecnology and productivity of teak plantations in Southeast Asia. *Unasylya, Roma*, v.51, p.61, 2000.
- FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO ESTADO DE MATO GROSSO-FAMATO. Diagnóstico de florestas plantadas do estado de Mato Grosso. Cuiabá: FAMATO, 2013. 106 p.
- FÉHER, A.; PASTERNAK, T. A.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, v. 74, p. 201-228, 2003.
- FEHÉR, A. Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim Biophys Acta*, v. 1849, p. 385-402, 2015.
- FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M.; REZENDE, J. C. Calogênese em plântulas de figueira. *Revista Ceres*, 54(312), p. 112-117, 2007.
- FERREIRA, B.G.A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; CARPANEZZI, A.A.; TAVARES, F.R.; KOEHLER, H.S. Metodologias de aplicacao de AIB no enraizamento de estacas semilenhosas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, Botucatu, v.11, n.2, p.196-201, 2009.
- FIGUEIREDO, E. O. Teca (*Tectona grandis* L.f): produção de mudas tipo toco. Rio Branco: Embrapa Acre, 2005, 22 p. (Série Embrapa Acre, Documentos, 101).
- FILONOVA, L.H.; BOZHKO, P.V.; BRUKHIN, V.B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; VON ARNOLD, S. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science, London*, v. 113, p. 4399-4411, 2000.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell, Berlin*, v. 17, p. 1866-1875, 2005. DOI 10.1105/tpc.105.033589.

- FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUSAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, Cambridge, p. 436-442, 2006. DOI 10.1016/j.pbi.2006.05.014
- FURTADO, M. B. Indução e controle da embriogênese somática em *O. catharinensis* e *O. odorifera* (Lauraceae). Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Ed.). *Adventitious root formation in cuttings*. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p. 117-131.
- GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J.F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, v.37, p.263-285, 2002.
- GERA, M.; GERA, N.; SINCH, V.K. Rooting response of root cuttings of some mpt species under low cost mist conditions. *Indian Forester*, DehraDun, v.126, p.171-174, 2000.
- GOH, D.; MONTEUUIS, O. Rationale for developing intensive teak clonal plantations, with special reference to Sabah. *Bois et Forêts des Tropiques*, Paris, v. 28, n. 3, p. 5-15, 2005.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/CBAB, 1998. v.1. p.183-260.
- GREENWOOD, M.S. Juvenility and maturation in conifers. current concepts. *Tree Physiology*, Victoria, v. 15, p. 433-438, 1995.
- GRUPTA, S. D.; DATTA, S. Antioxidant enzyme activities during in vitro morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidant on plant regeneration. *Biol Plant*, v. 47, p. 179-183, 2004.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: *Culturas de tecidos e transformação genética em plantas*. Brasília: Embrapa-CBAB, v. 2, p. 533-568, 1999.
- GUPTA, P.K.; NADGIR, A.L.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANNATHAN, V. Tissue culture of Forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. *Plant Science Letters*, Amsterdam, v.17, p.259-268, 1980.
- GYVES, E.M.; RUGINI J.I. E. Efficient method of micropropagation and in vitro rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large-scale industrial plantations. *Annual For. Science*, Nancy, v. 64, p.73-78, 2007.

- HACKETT, WP. Juvenility and maturity. In: BONGA, JM; DURZAN, DJ (Ed.). Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 216-148, 1987.
- HALL, R.H. Cytokinins as a probe of developmental processes. Annual Review of Plant Physiology, v.24, p.415-44, 1975.
- HARTMANN, H. T. et al. Plant propagation: principles and practices. 8 Ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915 p.
- HAZUBSKA-PRZYBYŁ, T.; BOJARCZUK, K. Somatic embryogenesis of selected spruce species (*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens* 'Glauc' and *P. breweriana*). Acta Societatis Botanicorum Poloniae, v. 77, p. 189–199, 2008.
- HECHT, V. et al. The Arabidopsis Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 Gene Is Expressed in Developing Ovules and Embryos and Enhances Embryogenic Competence in Culture. Plant Physiology, v. 127, n. 3, p. 803-816, 2001.
- HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L. de A.; GONÇALVES, A.N. Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus*. Piracicaba: IPEF, 2002. 21 p. (IPEF Circular Técnica, 194).
- HUTCHINSON, M.J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P.K. Morphological and physiological changes during thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. International Journal of Plant Sciences, Chicago, v. 157, n. 4, p. 440-446, 1996.
- JIMÉNEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.13, n.2, p.196-223, 2001.
- KAOSAARD, A.; SUANGTHO, V.; KJAER, E.D. Experience from tree improvement of teak (*Tectona grandis*) in Thailand. Technical Note Danida Forest Seed Centre. Denmark, Hoersholm, v.50, 8p, 1998.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology, New York, v.27, p.137-138, 1965.
- KARPINSKI, S., REYNOLDS, H., KARPINSKA, B., WINGSLE, G., CREISSEN, G.; MULLINEAUX, P. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis. Science, v. 284, p. 654-657, 1999.
- KJAER, E. D.; FOSTER, G. S. The economics of tree improvement of teak. Hum Lebaek: Danida Forest Seed Centre. 1996. 17 p.
- KLIMASZEWSKA, K.; CARDOU, M.B.; CYR, D.R.; SUTTON, B.C.S. Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant v. 36, p. 279–286, 2010.

- KLUCHER, K. M. et al. The AINTEGUMENTA Gene of Arabidopsis Required for Ovule and Female Gametophyte Development Is Related to the Floral Homeotic Gene APETALA2. *The Plant Cell Online*, v. 8, n. 2, p. 137- 153, 1996.
- KOLLERT, W.; CHERUBINI, L. Teak resources and market assessment 2010 (*Tectona grandis* Linn. F.). Rome: FAO, 2012. 42 p.
- KONG, L.; ADERKAS, P.V.; OWEN, S.J.; JAQUISH, B.; WOODS, J.; ABRAMS, S.R. Effects of stem girdling on cone yield and endogenous phytohormones and metabolites in developing long shoots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *New Forest*, v.43, p.491-503, 2012.
- KUMAR, A. Teak seed improvement – achievements and problems. *India Forester*, Dehra Dun, v.118, 525-533, 1992.
- LAMPRECHT, H. Silvicultura nos trópicos: ecossistemas florestais e respectivas espécies arbóreas- possibilidades e métodos de povoamento sustentado. Eschborn: Instituto de Silvicultura da Universidade de Göttingen, 1990. p. 310-313.
- LARCHER W. *Ecofisiologia Vegetal*. Sao Carlos: RiMa Artes e Textos, 2000. 531p.
- LEITZKE LN; DAMIANI CR; SCHUCH MW. Influencia do meio de cultura, tipo e concentracao de citocininas na multiplicacao in vitro de amoreira-preta e framboeseira. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.34, n.2, p.352-360, 2010.
- LAUKKANEN, H.; HAGGMAN, H.; SOPPELA, S.K.; HOHTOLA. Tissue browning of in vitro cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiologia Plantarum*, v.106, p.337-343, 1999.
- LELU-WALTER, M.A.; THOMPSON, D.; HARVENGT, L.; SANCHEZ, L.; TORIBIO, M.; PÂQUES, L.E. Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genetics & Genomes*, v. 09, 2013.
- LITZ, R. E.; CHAVEZ, V. C.; MOON, P. A. Induction of embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination. In: MANTELL, S.H.; BRUNS, S.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. (Ed.). *Recent advances in biotechnology for conservation and management*. International Foundation for Science, Stockholm:, p. 232-243, 1998.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commerciallyfeasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*, v.30, p.421-427, 1980.
- LUKMANDARU, g.; TAKAHASHI, K. variation in the natural termite resistance of teak (*Tectona grandis* Linn. fil.) wood as a function of tree age. *Annals of Forest Science*, Les Ulis, v. 65, p. 708, 2008.

- MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response to alga cells. *Journal of Plant Physiology*, v.157, p.183-193, 2000.
- MESQUITA, A.C.; PAIVA, R.; SANTIAGO, E.J.A.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, L.V.; GOMES, G .A.C. Análises bioquímicas de calos obtidos de segmentos foliares de lechieira (*Litchichinesnsis* Sonn.). *Magistra*, v.14, n.1, p.1-6, 2002.
- MILLER, G.; SCHLAUCH, K.; TAM, R.; CORTES, D.; TORRES, M.; SHULAEV, V.; DANGL, J.L.; MITTLER, R. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Plant Biology*, Stuttgart, v. 2, p. 1-11, 2009. DOI 10.1126/scisignal.2000448.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, Oxford, v. 9, n. 10, p. 490-498, 2004. DOI 10.1016/j.tplants.2004.08.009.
- MORDHORST, A. P. et al. Somatic Embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* Is Facilitated by Mutations in Genes Repressing Meristematic Cell Divisions. *Genetics*, v. 149, n. 2, p. 549-563, 1998.
- MOURA, E. F. Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica. 2007, 83 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- MOURA, L.C.; TITON, M.; FERNANDES, J.S.C.; SANTANA, R.C.; OLIVEIRA, M.L.R. Micropropagacao de Sucupira-preta por meio de gemas axilares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.47, n.12, p.1691-1698, 2012.
- MURILLO, O.; BADILLA, Y. Breeding teak in Costa Rica. In: LI, B.; MCKEAND, S. (Eds.) *Forest genetics and tree breeding in the age of genomics – progress and future*. Raleigh: North Carolina State University, 2004. p. 105-110.
- MURILLO, O.; ROJAS, J. L.; BADILLA, Y. *Reforestación Clonal*. Cartago, Costa Rica Taller de Publicaciones. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Ing. Forestal. 2003. 36 p.
- NAKHOODA, M.; WATT, M.P.; MYCOCK, D. Auxin stability and accumulation during in vitro shoot morphogenesis influences subsequent root induction and development in *Eucalyptus grandis*. *Plant Growth Regulation*, v.65, p.263-271, 2011.

- NICODEMUS, A.; NAGARAJAN, B.; MANDAL, A. K.; SUBRAMANIAN, K. Genetic improvement of teak in India Potentials and Opportunities in Marketing and Trade of Plantation Teak: Challenge for the New Millennium. In: Proceedings of Third Regional Seminar on Teak July 31–August 4, 2000. Yogyakarta, Indonesia: Faculty of Forestry Gadjah Mada University, 2000. p. 277-294.
- NIEVES, N.; SEGURA-NETO, M.; BLANCO, M.A.; SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, J.L.; CASTILLO, R. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, v.39, p.343-345, 2003.
- NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M.D.; SOARES, G.D.A.; SOARES, F.P.; CASTRO, A.H.F.; PAIVA, P.D.O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Ciência e Agrotecnologia, v.31, n.2, p.366-370, 2007.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Revista Brasileira de Biociências, v. 5, n. 2, p. 48-50, 2007.
- NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; LIMA, E.C.; SOARES, G.A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B.R.; EMRICH, E.B.; CASTRO, A.H.F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Revista Brasileira de Plantas Medicinaias, v.10, n.1, p.44-48, 2008.
- NUNES, R.C.A.; VIANA, R.S.; NETO, N.B.M. Atividade enzimática da superóxido dismutase em resposta aos fitorreguladores em *Gerbera jamensonii*. Comunicata Scientiae, v.6, p.83-89, 2005.
- OBERT, B.; BENSON, E.E.; MILLAM, S.; PRET'OVÁ, A.; BREMNER, D.H. Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax in vitro cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. Journal of Plant Physiology, Stuttgart, v. 162, n. 5, p. 537-547, 2005.
- OLMOS, E.; MARTÍNEZ-SOLANO, J.R.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E. Early steps in oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 54, n. 381, p. 291-301, 2003. DOI: 10.1093/jxb/erg028.
- PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Cultura de tecidos – Textos acadêmicos. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97p.
- PANDEY, D.; BROWN, C. Teak: a global overview. Unasylva, v. 51, n. 201, p. 3-13, 2000.
- PARK, Y.S.; BONGA, J.M. Application of somatic embryogenesis in forest management and research. Proceedings of the IUFRO Working Party 2.09.02 conference, Suwon, Republic of Korea, p. 3–8, 2010.
- PASQUAL M (2001) Meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 127p. (Textos Acadêmicos).

- PEREIRA, M.M.; NETO, A.J.M.; COSTA, E.R.; SANTOS, F.P.; SOUZA, F.P. Influencia do Tratamento de Sementes com Fitormonio sobre o Desenvolvimento de Plantulas de Sorgo (*Sorghum bicolor* L.). In: Anais... XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo 2010. Goiania: Associacao Brasileira de Milho e Sorgo; 2010. p.3646-3651.
- PERES, L.E.P; KERBAUY, G.B. Citocininas. In: KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452p.
- PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acacia sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.
- PINTO, K.S.; FERREIRA, L.T.; RIBEIRO, A.M.; CAMARA, T.R.; WILLADINOS, L.G. Avaliação do estresse in vitro em cana-de-açúcar: variedade rb867515. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10., 2010, Recife. Anais... Recife: UFRPE, 2010. p. 12-15.
- PREECE, F. E.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. *Biotechnology in agriculture and forestry: High-Tech and micropropagation I*. Berlin: Springer Verlag, 1991. p.168-189.
- RADOEVA, T.; WEIJERS, D. A roadmap to embryo identity in plants. *Trends Plant Sci*, v. 19, p.709–716, 2010.
- RAVEN, E.E. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara: Koogan; 2007.
- RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.
- ROBERTS, D.R.; LAZAROFF, W.R.; WEBSTER, F.B. Interaction between maturation and high relative humidity treatments and their effects on germination of Sitka spruce somatic embryos. *Journal of Plant Physiology*, v. 138, p. 1–6, 1991.
- SAN-JOSÉ, M.C.; CORREDOIRA, E.; MARTÍNEZ, M.T.; VIDAL, N.; VALLADARES, S.; MALLÓN, R.; VIEITEZ, A.M. Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* L. trees. *Plant Cell Reports*, v. 29, p. 661–671, 2010.
- SAVIDGE, R.A.; WAREING, P.F. Seasonal cambial activity and xylem development in *Pinus contorta* in relation to endogenous indol 3-ylacetic and (S)-abscisic acid levels. *Canadian Journal of Forest Research*, v.14, p.676–682, 1984.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, Rockville, v. 101, p. 7-12, 1993.
- SCHERES, B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 345–354.

- SCHMIDT, E.D.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.; DE VRIES, S.C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, v. 124, p. 2049–2062, 1997.
- SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, London, v. 52, p. 591-611, 1965.
- SHIMIZU, J. Y.; KLEIN, H.; OLIVEIRA, J. R. V. Diagnóstico das plantações florestais em Mato Grosso. Cuiabá: Central de Texto, 2007. 63 p.
- SMERTENKO, A.; BOZHKO, P.V. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical–basal patterning. *J Exp Bot*, v. 65, p.1343–1360, 2014.
- SOARES, F.P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; NERY, F.C.; VARGAS, D.P.; SILVA, D.R.G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo in vitro de *Hancornia speciosa* Gomes. *Ciencia e Agrotecnologia*, Lavras, v.35, n.1, p.152-157, 2011.
- SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, p. 351-355, 2007.
- SRINIVASAN, C. et al. Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta*, v. 225, n. 2, p. 341-351, 2007.
- STEIN, V. C.; PAIVA, R. VARGAS, D. P.; SOARES, F. P.; ALVES, E.; NOGUEIRA, G. F. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn. *Revista Árvore*, v. 34, n.5, p. 789-796, 2010.
- STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.
- STEINMACHER, D.A. Germinação in vitro, criopreservação e embriogênese somática em pupunha. Florianópolis: UFSC, 2015. 146p. (Mestrado).
- SUGIMOTO, K.; JIAO, Y.; MEYEROWITZ, E.M. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev. Cell*, v.18, p.463–471, 2010.
- SULTAN, S. E. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history, *Trends Plant Sci.* 5 (2000) 537–542.
- TAIZ L, ZEIGER E (2004) Fisiologia vegetal. Porto Alegre, Artmed. 719p.

- THOMPSON, D. 2014. Challenges for the large-scale propagation of forest trees by somatic embryogenesis – a review. Proceedings of the Third International Conference of the IUFRO unit 2.09.02 on “Woody Plant Production Integrating Genetic and Vegetative Propagation Technologies”, Vitoria-Gasteiz, Spain, pp. 81–91.
- TORIBIO, M.; FERNÁNDEZ, C.; CELESTINO, C.; MARTÍNEZ, M.T.; SAN-JOSÉ, M.C.; VIEITEZ, A.M. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 76, p. 283–287, 2004.
- TSUKAMOTO FILHO, A. A.; SILVA, M. C.; COUTO, L.; MULLER, M. D. Análise econômica de um plantio de teca submetido a desbastes. *Árvore*, v. 27, n. 4, p. 487-494, 2003.
- VIEIRA, D.P. Efeitos do ácido indolbutírico (AIB) e cinetina no enraizamento de estacas em *Tibouchina sellowiana* (Cham.) Cogn., *Xylopia brasiliensis* Spreng. e *Ocotea catharinensis* Mez. 2011. 45f. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.
- VIET, L.F. Teca uma visão geral. *Revista da madeira*, São Paulo, v.5, n.30, p.24-26, 1996.
- VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Piracicaba, v. 17, p. 129-143, 2005.
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. *Floresta e Ambiente*, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 187-194, 2001.
- WENDLING, I. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras. Colombo: EMBRAPA Florestas. 2003. 45 p.
- WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, K. V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. A. Controle da calogênese do pau brasil in vitro. *Árvore*, Viçosa-MG, v.33, n.6, p.987-996, 2009
- WHITE, K. J. Teak: some aspects of research and development. RAPA publication: 1991/17. Bangkok: FAO Regional Office for Asia and the Pacific (RAPA). 1991. 53 p.
- WILLEMSSEN, V.; SCHERES, B. Mechanisms of Pattern Formation in Plant Embryogenesis. *Ann Rev Genet*, v. 38, p. 587-614, 2004.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. *Silvicultura clonal: princípios e técnicas*. 2 Ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2013. 279 p.
- YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Rev Plant Sci*, v. 29, p. 36-57, 2010.

ZAVATTIERI M. A.; FREDERICO A.M.; LIMA. M.; SABINO, R.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions, *Electron. J. Biotechnol*, v. 13, p. 1–9, 2010.