MARCELO BREGOLA FURTADO

**Indução e controle da embriogênese somática em
Ocotea catharinensis e *Ocotea odorifera* (Lauraceae)**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantã/IPT
como parte dos requisitos necessários para a
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.**

**SÃO PAULO
2010**

MARCELO BREGOLA FURTADO

**Indução e controle da embriogênese somática em
Ocotea catharinensis e *Ocotea odorifera* (Lauraceae)**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantã/IPT
como parte dos requisitos necessários para a
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.**

**Área de concentração: Cultura de Tecidos
Vegetais**

Orientadora: Dra. Eny Iochevet Segal Floh

Co-orientadora: Dra. Claudete Santa Catarina

**SÃO PAULO
2010**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Furtado, Marcelo Bregola.

Indução e controle da embriogênese somática em *O. catharinensis* e *O. odorifera* (Lauraceae) / Marcelo Bregola Furtado. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Eny lochevet Segal Floh.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Cultura de tecidos vegetais. Linha de pesquisa: Embriogênese somática.

Versão do título para o inglês: Induction and control of the somatic embryogenesis in *O. catharinensis* and *O. odorifera* (Lauraceae).

Descritores: 1. Embriogênes somática 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Biotecnologia 4. *O. catharinensis* 5. *O. odorifera* I. Floh, Eny lochevet Segal II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Cultura de Tecidos Vegetais III. Título.

ICB/SBIB0234/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Marcelo Bregola Furtado.

Título da Dissertação: Indução e controle da embriogênese somática em *O. catharinensis* e *O. odorifera* (Lauraceae).

Orientador(a): Eny Iochevet Segal Floh.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

“Cure o mundo, torne-o um lugar melhor para você, para mim e para toda a humanidade”

Michael Jackson

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me protege me dá forças e ilumina meu caminho.

Ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do Mestrado.

À Prof^a Dra. Eny Iochet Segal Floh, pessoa que desempenhou um papel de importância fundamental na minha vida ao ter aberto as portas do BIOCEL, agradeço pela oportunidade, pela orientação e paciência.

À Dra. Claudete Santa-Catarina pela co-orientação e pelas valiosas contribuições científicas ao trabalho.

A todos os professores da graduação e pós-graduação pelos ensinamentos.

Ao Instituto Florestal - SP que concedeu permissão para as coletas, em especial ao Sr. Osny Tadeu de Aguiar por ter indicado a localização das árvores da espécie *O. odorífera*, ao Sr. Hugo que tinha a missão de subir nas árvores para coletar os frutos e ao Sr. Eraldo, guia do PE Carlos Botelho, que nos conduziu pelas trilhas na floresta.

Aos amigos do BIOCEL Amanda, André, Cíntia, Felipe, Júlia, Roberta, Thiago e Vanildo pela amizade e convivência no laboratório, em especial à Fernanda Pieruzzi e Leonardo Carnevalli pela companhia nas coletas e auxílio na indução das culturas embriogênicas.

À Carminha, técnica do BIOCEL, pelo apoio e simpatia de sempre.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia Eliana, Fábiana e Marcos, sempre prestativos e à disposição.

À Geóloga Ana Lúcia, chefe do setor de Fiscalização do DNPM pela compreensão e por ter permitido que me ausentasse do serviço em várias oportunidades para que pudesse cumprir os créditos, comparecer a reuniões com minha orientadora e que dedicasse parte do tempo de meu expediente para redigir e finalizar este trabalho.

Ao amigo e parceiro de tênis Penteado pelo auxílio com as escalas das fotografias.

À amada Priscila por todo amor, carinho, pela paciência com minhas mudanças de humor e pelo importante auxílio na elaboração deste trabalho e às minhas filhas queridas Marina e Luana, sou abençoado por vocês fazerem parte da minha vida.

Aos meus pais José Carlos e Ana Maria. Se trilhei este caminho e cheguei até aqui foi graças à educação e todo esforço e apoio a mim dispensados e aos meus irmãos Roberto e Renato pela amizade de toda uma vida.

Aos demais familiares, avós (*in memoriam*), tios, sobrinhos, primos, em especial aos meus segundos pais: meu sogro André e minha tia-sogra Maria Luíza

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho o meu profundo e sincero agradecimento.

RESUMO

FURTADO, M.B. **Indução e controle da embriogênese somática em *Ocotea catharinensis* e *Ocotea odorifera* (Lauraceae)**. Dissertação - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Ocotea catharinensis e *Ocotea odorifera* são árvores originárias da Mata Atlântica, de ocorrência natural nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo. Historicamente estas espécies foram intensamente exploradas para a obtenção de madeira e atualmente encontram-se na lista de espécies ameaçadas de extinção. A embriogênese somática apresenta-se como uma ferramenta de grande potencial na propagação de espécies recalcitrantes e de difícil propagação, como *O. catharinensis* e *O. odorifera*. No presente trabalho foi analisado o efeito de diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento na indução de culturas embriogênicas nestas espécies. Para isso, eixos embrionários de sementes maduras foram isolados e inoculados em meio de cultura MS ou WPM suplementados com os reguladores de crescimento ANA ou 2,4-D nas concentrações 0, 9, 18, 36, 72 e 144 μM . Em *O. catharinensis*, a adição de 2,4-D ao meio de cultura WPM mostrou-se mais efetiva na indução de calos compactos, com resultados mais expressivos no tratamento contendo 144 μM de 2,4-D. Os menores índices de indução foram obtidos no meio MS suplementado com 2,4-D, independente da concentração, observando-se alta taxa de oxidação dos embriões. Em *O. odorifera* a adição de ANA ou 2,4-D ao meio de cultura WPM nas maiores concentrações propiciou maior indução de calos compactos, sendo 2,4-D mais efetivo.

Palavras-chave: Embriogênese somática; Cultura de tecidos vegetais; Biotecnologia; *Ocotea catharinensis*; *Ocotea odorifera*.

ABSTRACT

FURTADO, M.B. **Induction and control of somatic embryogenesis in the *Ocotea catharinensis* and *Ocotea odorifera* (Lauraceae).** Dissertação - Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo, São Paulo, 2010.

Ocotea catharinensis and *Ocotea odorifera* are trees from the Atlantic Forest, found naturally in the states of Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul and São Paulo. Historically these species were greatly explored to obtain wood and are currently included at the endangered species list. Somatic embryogenesis is found to be a tool with great potential for the propagation of recalcitrant's and of difficult propagation species, such as *O. catharinensis* and *O. odorifera*. In the present study the effects of different culture mediums and growth regulators were analyzed in the induction of embryogenic cultures in these species. To do so, mature embryonic axis were isolated and inoculated in the culture medium MS or WPM supplemented with the growth regulators ANA or 2,4-D in the following concentrations 0, 9, 18, 36, 72 e 144 μM . In *O. catharinensis*, the addition of 2,4-D to the WPM culture medium presented to be more effective in the compact callus induction, and the most expressive results were observed at the treatment containing 144 μM of 2,4-D. The worst induction index was obtained at the MS medium supplemented with 2,4-D, in all the concentrations, observing high embryo's oxidation rate. In *O. odorifera* the addition of higher concentrations of ANA or 2,4-D to the WPM culture medium propitiated higher percentuals of compact callus induction, although the 2,4-D showed to be more effective.

Key Words: Somatic Embryogenesis; plant tissue culture; Biotechnology; *Ocotea catharinensis*; *Ocotea odorifera*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	14
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1	<i>Ocotea catharinensis</i> e <i>Ocotea odorifera</i>	15
3.2	Micropropagação em arbóreas.....	16
3.3	Embriogênese zigótica.....	18
3.4	Embriogênese somática.....	19
3.5	Indução da embriogênese somática.....	22
3.5.1	Explante.....	25
3.5.2	Reguladores de crescimento.....	26
3.5.3	Meio de cultura.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	Material Vegetal.....	31
4.2	Assepsia.....	31
4.3	Indução da embriogênese somática.....	31
4.4	Manutenção das culturas embriogênicas.....	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1	<i>Ocotea catharinensis</i>	34
5.2	<i>Ocotea odorifera</i>	48
6	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
	ANEXOS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica está localizada na costa Atlântica entre as latitudes 6° S e 30° S e longitudes 30° W e 50° W, com altitudes variando do nível do mar até 2.700 metros (LIMA e CAPOBIANCO, 1997). Ainda que restem exíguos 7,3% de sua área original, a Mata Atlântica apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta (SIMÕES e LINO, 2002), com aproximadamente 10 mil espécies vegetais, sendo 50% endêmicas (LIMA e CAPOBIANCO, 1997).

Os recursos florestais envolvendo espécies nativas têm sido historicamente explorados de maneira extrativista. Adicionalmente, alguns fatores como a floração esporádica, a baixa viabilidade das sementes e o crescimento lento de várias espécies nativas brasileiras, associados ao conhecimento limitado sobre a ecologia e biologia reprodutiva dessas espécies, resultam num número reduzido de programas de conservação e florestamento com espécies arbóreas nativas. A médio e longo prazo é inevitável a necessidade de um programa de recuperação e reposição dessas espécies, com as finalidades de proteção e de produção sustentável de produtos comerciais (VIANA et al., 1999). Entretanto, programas desta natureza tem esbarrado em vários problemas, especialmente quando se utilizam os métodos de propagação tradicionais.

As espécies *Ocotea catharinensis* e *Ocotea odorifera*, conhecidas popularmente como canela preta, e canela sassafrás, respectivamente, são originárias da Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Densa), de ocorrência natural nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo (CARVALHO, 1994; SANTA-CATARINA et al., 2001). Estas espécies foram intensamente exploradas até a década de 70 para a produção de madeira (REITZ et al., 1978; CARVALHO, 1994) e óleo sassafrás (SANTA-CATARINA et al., 2001).

A propagação sexuada de genótipos destas espécies no seu local de ocorrência é dificultada, pois a produção de sementes é esporádica (CARVALHO, 1994). Trabalhos mostraram que a formação e o desenvolvimento completo do embrião ocorre num período de aproximadamente 360 dias (SANTA-CATARINA et al., 2001; SANTA-CATARINA et al., 2006), período relativamente longo quando

comparado aos embriões de outras angiospermas. As sementes destas espécies são suscetíveis ao ataque de insetos e fungos antes e após a maturação fisiológica, e o elevado teor de óleo provoca a oxidação e deterioração rápida das sementes, determinando uma baixa taxa de germinação. Associado a estas características destaca-se ainda a ocorrência de alternância de floração nessas espécies, o que dificulta a obtenção de sementes, além da baixa resposta à propagação vegetativa convencional por estaquia (CARVALHO, 1994).

Técnicas biotecnológicas, como a embriogênese somática, apresentam grande potencial de aplicação na produção de mudas para programas de reflorestamento, restauração de áreas degradadas e de melhoramento genético, pela facilidade de aplicação das técnicas de transformação genética, e em programas de conservação de germoplasma de árvores tropicais e subtropicais (VIANA et al., 1999).

Embriogênese somática é o processo pelo qual, através da técnica de cultivo *in vitro*, células isoladas ou um pequeno grupo de células somáticas dão origem a embriões somáticos, num processo morfogenético que se aproxima da seqüência dos eventos representativos da embriogênese zigótica (TAUTORUS et al., 1991). 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 (FÉHER et al., 2003).

A indução embriogênese somática é uma etapa 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). Segundo Chalupa (1999), o estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos utilizados como fonte de explante é fundamental para a expressão de seu potencial morfogenético e para o estabelecimento de culturas embriogênicas. Fatores relacionados à condição fisiológica do explante, às características da espécie e condições experimentais, como a composição do meio de cultura e 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.

A baixa taxa de indução de embriões somáticos e a baixa taxa de conversão destes em plantas completas são as principais limitações dos sistemas de embriogênese somática desenvolvidos para várias espécies lenhosas. Esta limitação tem sido observada para algumas espécies arbóreas, como a *Swietenia macrophylla* (MARUYAMA e ISHII, 1999), *Eucalyptus grandis* (WATT et al., 1999), *Persea americana* (WITJAKSONO et al., 1999), *O. catharinensis* (VIANA et al., 1999; VIANA et al., 2005) e *O. odorifera* (SANTA-CATARINA et al., 2001).

Diante do exposto, faz-se necessário o estabelecimento de programas de conservação, incluindo-se o desenvolvimento de métodos não convencionais como o da embriogênese somática, para a propagação e reprodução destas espécies. Estudos iniciais de indução da embriogênese somática foram estabelecidos para *O. catharinensis* e *O. odorifera* (MOURA-COSTA et al., 1993; VIANA e MANTELL, 1999; SANTA-CATARINA et al., 2001; VIANA et al., 2005). Entretanto, novos trabalhos necessitam ser realizados no sentido de sincronizar a indução e a expressão da embriogênese somática.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é a indução de culturas embriogênicas em *O. catharinensis* e *O. odorifera*.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito das auxinas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e ANA (ácido naftalenoacético) na indução da embriogênese somática;
- Estudar o efeito dos meios de cultura MS e WPM no processo de indução da embriogênese somática;
- Avaliar a ontogênese do desenvolvimento de embriões somáticos durante a indução da embriogênese somática.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Ocotea catharinensis* e *Ocotea odorifera*

O. catharinensis, conhecida popularmente como canela-preta, é uma espécie ameaçada originária da Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Densa), de ocorrência natural nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo (CARVALHO, 1994). Trata-se de uma espécie que produz flores esporadicamente e suas sementes tem viabilidade curta. O aumento da pressão de extração sobre esta espécie reduziu drasticamente sua frequência, afetando os mecanismos naturais de reprodução. Há poucas informações disponíveis a respeito da biologia reprodutiva, fisiologia e propagação da espécie (VIANA e MANTELL, 1999).

Fonte: Lorenzi, 1992

O. catharinensis

Fonte: Lorenzi, 1992

O. odorifera

O. odorifera Mez, popularmente conhecida como canela sassafrás é uma espécie originária da Mata Atlântica, intensamente explorada entre as décadas de 40 e 70 para a extração do óleo de sassafrás. De acordo com Reitz et al. (1978), no Estado de Santa Catarina este extrativismo caracterizou-se como importante fonte de renda no Alto do Vale do Rio Itajaí visando, principalmente, a exportação do óleo para utilização na indústria alimentar, farmacêutica e agroquímica. Isso ocasionou uma redução na população original resultando em inclusão na lista de espécies ameaçadas de extinção (VIANA et al., 1999).

A propagação sexual de genótipos de *O. odorifera* e *O. catharinensis* em seu local de ocorrência é dificultada pela produção irregular de sementes e pela baixa

viabilidade, em virtude de serem espécies recalcitrantes (SANTA-CATARINA et al., 2001; SANTA-CATARINA et al., 2006), o que significa que sementes destas espécies não podem ser armazenadas por longos períodos sem que haja perda na viabilidade das mesmas. Além disso, segundo Carvalho (1994), as sementes destas espécies são suscetíveis ao ataque por insetos e fungos durante a fase de maturação fisiológica e seu elevado teor de óleo provoca rápida deterioração da semente determinando uma baixa taxa de germinação. A propagação vegetativa por estaquia é impossibilitada pela relação inversa entre o enraizamento e a idade da planta doadora (SANTA-CATARINA et al., 2001).

Uma característica de importância econômica das árvores pertencentes ao gênero *Ocotea* é a produção significativa de óleos essenciais, que são utilizados na indústria de cosméticos, e ligninas e neoligninas, importantes compostos com efeito citotóxico contra células tumorais (VIANA e MANTELL, 1999). Estudos conduzidos por Lordello (1996) em 34 espécies do gênero *Ocotea*, e Funasaki et al. (2009) com culturas embriogênicas de *O. catharinensis* demonstraram a produção de classes importantes de metabólitos secundários como alcaloides, lignoides, flavonoides, esteroides, monoterpenos e sesquiterpenos. Estudos em embriogênese somática demonstraram que a biossíntese de neolignina está associado aos processos de diferenciação celular.

Os estudos fitoquímicos nessas espécies são dificultados pela falta de material vegetal prontamente disponível, destacando-se então a necessidade de desenvolvimento de sistemas de cultura de tecidos como alternativa para o estudo da biossíntese desses compostos (VIANA e MANTELL, 1999).

3.2 Micropropagação em arbóreas

A base da biotecnologia moderna reside na totipotencialidade da célula vegetal, princípio biológico pelo qual toda célula possui a capacidade de originar uma nova planta. Esta idéia proposta por Schleiden, Schwann, Virchow e Vochting, no século XIX apontava que algumas células elementais, animais ou vegetais, quando separadas do organismo, eram capazes de continuar crescendo e se desenvolvendo se apenas fosse provido das condições que existia no organismo. Haberlandt em 1902 foi o primeiro a tentar obter evidências experimentais da totipotência através do

cultivo, em soluções nutritivas, de diferentes tecidos de várias espécies de plantas na esperança de regenerá-las (VASIL, 2008).

Nos Estados Unidos da América (EUA), Philip Rodney White foi o primeiro a obter crescimento indefinido de tecido vegetal. Em 1934 foi capaz de manter ápices caulinares de tomateiro em cultura por tempo indefinido e seus trabalhos levaram à descoberta de que meristemas radiculares eram livres do vírus do mosaico. Na década de 50, a aplicação dessas informações levou George Morel a obter plantas de tomateiro livres do vírus de mosaico a partir do cultivo *in vitro* de ápices caulinares (VASIL, 2008).

De acordo com Watt et al. (1999) a principal vantagem da micropropagação, comparado a outros métodos de propagação vegetativa, é a rapidez, além da possibilidade de multiplicação de espécies nas quais os métodos de reprodução vegetativa convencionais consistem num entrave para o sistema.

Espécies propagadas vegetativamente apresentam potencial para incrementar a produção florestal. A reprodução por estaquia é normalmente limitada a plantas jovens, devido à perda da capacidade de enraizamento durante seu desenvolvimento. A partir de técnicas de micropropagação é possível propagar genótipos selecionados e reproduzir um grande número de plantas num curto período de tempo (CHALUPA, 1999). Adicionalmente, as técnicas de modificação genética dependem exclusivamente da micropropagação para regeneração e multiplicação de novos genótipos (WATT et al., 1999).

Em comparação às demais espécies de interesse agrônômico, árvores florestais tem tido relativamente pouca domesticação. Consequentemente, a utilização de ferramentas biotecnológicas como propagação *in vitro* e transferência de genes nessas espécies tem recebido relativamente pouca atenção, muito embora o emprego da biotecnologia no setor florestal tenha capacidade de criar o mesmo impacto causado na agricultura em geral. Similarmente, ao longo das últimas quatro décadas, o foco da produção de mudas de espécies arbóreas tem sido restrito a um pequeno grupo de coníferas, tanto no método convencional quando no que diz respeito à pesquisa biotecnológica (MERKLE e NAIRN, 2005).

3.3 Embriogênese zigótica

A embriogênese zigótica é um processo complexo, altamente organizado, que desempenha um papel fundamental no ciclo de vida das plantas superiores e tem início a partir da fusão dos gametas masculino e feminino formando o embrião, o qual, após sucessivas transformações morfológicas, dá origem à semente madura (SANTA-CATARINA et al., 2006). Em angiospermas a fecundação é dupla, pois também ocorre a união de um gameta masculino com dois núcleos polares formando o endosperma que consistirá no tecido de nutrição do embrião em desenvolvimento (TAIZ e ZEIGER, 2004)

Este processo pode ser dividido em duas etapas principais, uma fase morfogênica inicial, caracterizada por divisão celular e início da diferenciação, seguida por uma fase de maturação que envolve o acúmulo de substâncias de reserva e preparação para a dessecação, dormência e germinação da semente (SANTA-CATARINA et al., 2006).

O estudo do processo que leva ao desenvolvimento do embrião zigótico é limitado pela localização no interior da semente, inacessível à manipulação experimental, especialmente durante as fases iniciais da embriogênese (GOLDBERG et al., 1994).

Nos estudos de embriogênese a *Arabidopsis thaliana* é uma espécie modelo e o padrão de desenvolvimento de seu embrião zigótico tem sido amplamente estudado (MORAES, 2006). O desenvolvimento do embrião zigótico em dicotiledôneas pode ser dividido, geralmente, em quatro estágios seqüenciais que compreendem modificação morfogenética, a saber, globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (QUIROZ-FIGUEROA, 2006).

Santa-Catarina et al. (2006) estudando o desenvolvimento do embrião zigótico em *O. catharinensis* identificaram diferentes estádios de desenvolvimento do embrião descrevendo-os como: estágio cordiforme inicial com endosperma, precotiledonar com endosperma, cotiledonar e maduro. Em *O. odorifera* não existem trabalhos que descrevem os estágios de desenvolvimento embrionário.

3.4 Embriogênese somática

Embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas, sob condições específicas de indução, geram células embriogênicas que, através de uma série de modificações estruturais e bioquímicas, resultam na formação do embrião somático (TAUTORUS et al., 1991; QUIROZ-FIGUEROA, 2006). Este processo morfogênético é ideal para investigar o processo de diferenciação em plantas, bem como a expressão dos mecanismos de 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 (TAUTORUS et al., 1991).

Conforme Vasil (2008) foi Haberlandt, em 1902, quem primeiro apontou para a possibilidade de se cultivar, com sucesso, embriões somáticos a partir de células vegetativas em solução nutritiva. O desenvolvimento de embriões somáticos foi originalmente obtido a partir de experimentos realizados em cenoura (*Daucus carota*) por Steward e Reinert em 1958. Desde então a técnica tem sido utilizada em várias espécies de plantas (MORAES, 2006). Atualmente, conforme Vasil (2008), culturas embriogênicas são rotineiramente produzidas para uma grande variedade de espécies vegetais, incluindo a maior parte das espécies de importância econômica.

O padrão de desenvolvimento de um embrião somático apresenta características morfológicas semelhantes às do embrião zigótico em diferentes aspectos. Ambos são caracterizados pela diferenciação de uma estrutura bipolar constituída de ápice caulinar e radicular, ambos passam pelos estádios de desenvolvimento pré-embrionário e embrionário, a saber, globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA et al., 1999). Uma diferença marcante entre os embriões somáticos e zigóticos, conforme pode ser observado na Figura 1, está no fato dos embriões somáticos se desenvolverem livres de correlações físicas com o tecido maternal (ZIMMERMAN, 1993).

Fonte: Moraes, 2006

Figura 1 - Representação esquemática da ontogênese do embrião somático e zigótico demonstrando similaridade dos eventos representativos dos processos morfogênicos.

A modulação da embriogênese somática pode ser dividida em quatro fases distintas: 1) indução em meios de culturas contendo reguladores de crescimento como citocininas e auxinas; 2) multiplicação em meios contendo auxinas em baixas concentrações; 3) maturação em presença de ácido abscísico (ABA) e agentes osmóticos; e 4) germinação em meios de cultura isentos de reguladores de crescimento (DURZAN, 1988; FLOH et al., 2007).

Uma vez que o embrião somático se assemelha ao embrião zigótico em diversos aspectos, é possível estudar o processo de embriogênese pela análise dos embriões somáticos, fazendo da embriogênese somática um modelo para o estudo dos eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos que ocorrem durante a embriogênese em plantas superiores (QUIROZ-FIGUEROA, 2006).

Comparativamente às demais técnicas de micropropagação, a embriogênese somática apresenta as seguintes vantagens: a) permite a obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos); b) permite um alto grau de automatização, reduzindo os custos por unidade produzida, através da utilização de biorreatores; c) os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e pureza genética; d) pode ser utilizada como uma ferramenta integrada a programas de melhoramento genético florestal, em especial

quando associada à técnica de criopreservação, produzindo as sementes sintéticas; e) pode ser utilizada para a produção de metabólitos secundários (MERKLE e DEAN, 2000).

Conforme Watt et al. (1999) a embriogênese somática, se usada em conjunto com métodos convencionais, é uma técnica que contribui para a manutenção de características desejáveis e no resgate e conservação de genótipos superiores. Um sistema bem desenvolvido de embriogênese somática possibilita também a transformação genética e a criopreservação de linhagens selecionadas (MARUYAMA e ISHII, 1999; TORIBIO et al., 2008; CORREDOIRA et al., 2008)

A embriogênese somática é um método alternativo para a produção de grande quantidade de árvores uniformes num curto espaço de tempo (CHALUPA, 1999; PAIVA-NETO et al., 2003). O processo possibilita a produção de grande número de embriões somáticos com capacidade de originar plantas que podem ser utilizadas em programas de reflorestamento. Tal processo tem sido descrito para várias espécies arbóreas tais como *Tillia* spp. (CHALUPA, 1999), *Swietenia macrophylla* (MARUYAMA e ISHII, 1999), *Dalbergia* spp. e *Acacia* sp. (MERKLE e NAIRN, 2005), *Eucalyptus* spp. (WATT et al., 1999), *Persea americana* (WITJAKSONO e PLIEGO-ALFARO, 1999), *Araucaria angustifolia* (GUERRA et al., 2000), *Castanea sativa* (CORREDOIRA et al., 2006), *Cassia angustifolia* (AGRAWAL e SARDAR, 2007), *Bixa orellana* (PAIVA-NETO et al., 2003), *Quercus robur* (TORIBIO et al., 2008), *Olea europaea* (TRABELSI et al., 2003), *O. catharinensis* (VIANA et al., 1999; VIANA et al., 2005) e *O. odorifera* (SANTA-CATARINA et al., 2001), entre outras.

A baixa taxa de indução de embriões somáticos e a baixa taxa de conversão destes em plantas completas são as principais limitações dos sistemas de embriogênese somática desenvolvidos para várias espécies lenhosas. Esta limitação tem sido observada para algumas espécies arbóreas, como a *Swietenia macrophylla* (MARUYAMA e ISHII, 1999), *Eucalyptus grandis* (WATT et al., 1999), *Persea americana* (WITJAKSONO et al., 1999), *O. catharinensis* (VIANA et al., 1999; VIANA et al., 2005) e *O. odorifera* (SANTA-CATARINA et al., 2001).

Segundo Park et al. (1998) uma vantagem fundamental da embriogênese somática sobre os outros métodos de micro e macro propagação está no fato de que as culturas embriogênicas podem ser criopreservadas e armazenadas enquanto os

testes de campo são conduzidos para identificar genótipos com significativo ganho genético.

A clonagem de embriões por intermédio do método de embriogênese somática é considerada por muitos como a forma menos dispendiosa para produção de plantas uniformes, especialmente aquelas que são difíceis de propagar por métodos convencionais. Nesse sentido, esforços recentes concentram-se no desenvolvimento e na otimização de protocolos para indução e maturação de embriões somáticos de angiospermas e coníferas (STASOLLA e YEUNG, 2003).

Watt et al. (1999), entretanto, atentam para o fato de que a propagação clonal de arbóreas via embriogênese somática necessita produzir grande número de plantas regeneradas para que seja considerado viável economicamente. Enquanto a embriogênese somática é relatada em várias espécies de acácia, por exemplo, apenas poucas destas produzem número de plantas suficientes para serem denominadas sistema de propagação.

Embora esta técnica já esteja estabelecida como uma eficiente forma de produção de mudas de árvores em larga escala, mais esforços são necessários principalmente no sentido de aumentar a taxa de embriões somáticos convertidos em plantas (STASOLLA e YEUNG, 2003).

3.5 Indução da embriogênese somática

Indução é o desencadeamento de um processo morfogenético pela exposição do explante a um estímulo físico, químico ou biológico. Embora envolva o controle da expressão gênica, não é um fenômeno genético, uma vez que não há modificação alélica ou genotípica. Em cultura de tecidos refere-se à sinalização por um fitormônio a uma resposta específica em nível celular (GUERRA e NODARI, 2006).

Na indução da embriogênese somática células haplóides ou diplóides em diferentes estádios de diferenciação podem, se adequadamente induzidas por estímulos ambientais ou químicos, serem reprogramadas e adquirir novas competências morfogenéticas (GUERRA et al., 1999). A transição do estado somático para o estado celular embriogênico é um processo complexo que inclui desdiferenciação, reativação e divisão celular, além de reprogramação metabólica e

do desenvolvimento. Células em transição do estado somático para o embriogênico são chamadas de células competentes, determinadas para a embriogênese, que devem conter um receptor inativo que seria ativado pela presença de um ligante próprio para disparar o programa embriogênico (FÉHER et al., 2003). O gene SERK (somatic embryogenesis receptor kinase) foi primeiramente descrito em culturas de células competentes de cenoura e foi demonstrado que este gene é um marcador para a competência das células somáticas se tornarem embriogênicas (SANTA-CATARINA et al., 2004).

Embora a totipotência seja uma importante característica das células vegetais, sob condições específicas nem todas as células a expressam. Segundo levantamento realizado por Quiroz-Figueroa et al. (2006) a capacidade de um dado tecido gerar embriões é uma característica restrita a uma limitada fração da população de células. Constatou também, em seu estudo com *Coffea arabica*, que calos embriogênicos diferiram dos não embriogênicos pela coloração e pela friabilidade. Calos escuros e compactos originaram embriões, ao passo que calos claros e friáveis, não.

Dois padrões básicos da expressão da embriogênese somática podem ser observadas *in vitro* (Figura 2): o modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se diretamente do tecido do explante e o modelo indireto, no qual são originados a partir de um tecido intermediário, denominado calo. Calos em cultura apresentam células em diferentes estágios de diferenciação e, conseqüentemente, diferentes graus de determinação, podendo adquirir novas competências mediante a presença de um mensageiro químico específico. (GUERRA et al., 1999; QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006).

A embriogênese somática direta é característica de explantes nas quais as células são pré-determinadas para a rota embriogenética, como conseqüência da retenção de algumas das propriedades das células meristemáticas parentais das quais derivam. Isto poderia explicar a tendência da embriogênese somática ocorrer preferencialmente em explantes derivados de tecidos embrionários ou juvenis. Já a embriogênese indireta é característica de explantes derivados de tecidos mais maduros e diferenciados nos quais as células devem passar por vários ciclos antes de readquirir a competência embriogenética (GUERRA et al., 1999). De acordo com Paiva-Neto et al. (2003) a embriogênese direta reduz o tempo requerido para a

propagação de plantas e minimiza a indução de eventuais alterações genéticas na cultura.

Figura 2 - Fluxograma da embriogênese somática em *Ocotea catharinensis* num programa de reflorestamento (adaptado de Vianna e Mantell, 1999).

Culturas embriogênicas costumam liberar uma diversa e complexa variedade de compostos moleculares ao meio, tais como polissacarídeos, polipeptídeos, aminoácidos, substâncias reguladoras de crescimento, vitaminas e compostos de baixo peso molecular, que desempenham importante papel no desenvolvimento da embriogênese somática, inibindo-a ou induzindo-a (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006).

A capacidade de indução de culturas embriogênicas difere entre os genótipos e também é dependente do tipo de explante, bem como seu estágio de desenvolvimento, da composição do meio de cultura, da concentração e do tipo de regulador de crescimento utilizado (LITZ et al., 1998; CHALUPA, 1999; CARNEROS et al. 2009; PRAKASH e GURUMURTHI, 2009).

3.5.1 Explante

A indução da embriogênese somática é influenciada por diversos fatores, contudo, as características do explante, principalmente o tipo e estágio de desenvolvimento são fatores determinantes da resposta embriogênica (CARNEROS et al., 2009; NEHRA et al., 2005). Segundo Stasolla e Yeung (2003), diferentes tecidos de uma mesma planta, ou o mesmo tecido em diferentes estágios de desenvolvimento apresentam respostas diferentes sob condições de cultivo *in vitro*.

A orientação e o posicionamento do explante no meio de cultura também podem influenciar a indução da embriogênese somática. Um estudo realizado por Ramarosandratana e Van Staden (2003) demonstrou que explantes colocados horizontalmente sobre o meio ou com o ápice voltado para baixo, tenderam a apresentar um menor percentual de indução.

Segundo Chalupa (1999), culturas embriogênicas são estabelecidas utilizando-se embriões zigóticos ou outro tecido jovem e o estágio dos embriões zigóticos utilizados como explante é fundamental para a expressão do seu potencial morfogênético. Watt et al. (1999) afirmam que em arbóreas as melhores respostas em indução da embriogênese somática são obtidas quando se utiliza material jovem ou em estado embriogênico.

O uso de embriões zigóticos imaturos é uma confiável fonte de explante (PAIVA-NETO et al., 2003). Por conta disso, a grande maioria dos programas de embriogênese somática em arbóreas utiliza como explante embriões zigóticos imaturos, conforme trabalhos realizados em diferentes espécies por Watt et al. (1999), Guerra et al. (2000), Santa-Catarina et al. (2001), Corredoira et al. (2006), Moon et al. (2005) e Sharma et al. (2005).

Embora a utilização de embriões zigóticos apresente melhores respostas na indução da embriogênese somática, não são indicados para a propagação clonal, uma vez que a maioria das espécies arbóreas apresenta polinização cruzada, ocasionando alta heterogeneidade, não havendo como garantir, portanto, a pureza genética do material selecionado (TORIBIO et al., 2008; PERERA et al., 2009; TROCH et al., 2009).

Há diversos relatos de casos bem sucedidos da regeneração de plantas a partir de sistemas de embriogênese somática originados de diferentes tipos de explantes, além dos embriões zigóticos, tais como tecidos florais (MAXIMOVA et al., 2008; PERERA et al., 2009; TROCH et al., 2009), foliares (CORREDOIRA et al., 2006; SLIWINSKA et al., 2008; OTHMANI et al., 2009; SRISKANDARAJAH e LUNDQUIST, 2009), cotilédones (TRABELSI et al., 2003; MARTIN e MADASSERY, 2005; AGRAWAL e SARDAR, 2007) e caulinares (MARUYAMA e ISHII, 1999; TORIBIO et al., 2004; DHEKNEY et al., 2008).

3.5.2 Reguladores de crescimento

Hormônio vegetal é um termo que define uma classe de compostos de ocorrência natural que agem como sinais químicos e regulam os processos de crescimento e desenvolvimento (morfogênese) em plantas sendo, provavelmente, os mais importantes mediadores na transdução de sinais (GUERRA e NODARI, 2006). Em outras palavras, fitormônios são substâncias endógenas que exercem sua ação através do reconhecimento de receptores específicos presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (GUERRA et al., 1999). Fitorreguladores ou reguladores de crescimento, por outro lado, são substâncias sintéticas que mimetizam os efeitos dos hormônios no metabolismo celular.

Entre o final do século XIX e início do século XX, alguns cientistas, dentre eles Charles Darwin estudavam o efeito da luz na curvatura de plântulas. Observaram que se o ápice fosse coberto ou removido, a curvatura cessava, o que os levou a supor que determinada substância pudesse ser responsável pelo evento. Fritz Went em 1928 foi quem isolou e quantificou a substância e a denominou como hormônio, que mais tarde viria a ser identificada como a ocorrência natural da auxina ácido indol-acético (AIA). Pesquisadores como Thimann, Bonner e Skoog contribuíram de forma grandiosa para a compreensão da estrutura e função das auxinas e no desenvolvimento de uma ampla variedade de auxinas sintéticas como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), largamente utilizado em cultura de tecidos vegetais e na agricultura (VASIL, 2008).

Outras substâncias reguladoras de crescimento de ocorrência natural nas plantas e de grande impacto na cultura de tecidos são as citocininas, que foram

descobertas a partir do momento em que os cientistas perceberam que certas respostas só eram observadas quando o explante possuía algum tecido vascular, ou quando um extrato de tecido fosse adicionado ao meio, como endosperma líquido de frutos imaturos (leite de coco), por exemplo. Essas descobertas levaram ao isolamento da cinetina, substância capaz de induzir divisões celulares sob baixas concentrações. Somente algumas poucas formas de ocorrência natural das citocininas foram identificadas, porém, graças aos esforços de Skoog, principalmente, muitas destas substâncias, com variados níveis de atividade, foram sintetizadas (VASIL, 2008).

Skoog e Miller (1957) contribuíram significativamente ao apontar que interações quantitativas entre reguladores de crescimento, como auxinas e citocinina, especialmente AIA e cinetina, são capazes de promover a morfogênese de material cultivado *in vitro* de diversas formas, do alongamento celular à formação de órgãos. Trabalhando com cultura de tecidos de vários tipos de plantas como tabaco e feijão, demonstraram que alta concentração de AIA associada a uma baixa concentração de cinetina promovia a formação de raízes, enquanto que, com o inverso, havia o surgimento de gemas e eixos caulinares.

Reguladores de crescimento de plantas são substâncias chave para a indução da embriogênese somática e quase toda cultura de tecido *in vitro* utilizada para embriogênese somática é suplementada com altas concentrações destas substâncias (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). De uma maneira geral a embriogênese somática é induzida por auxinas fortes. Neste caso, uma célula somática adquire competência para originar uma linhagem de células filhas que irão formar o embrião somático (GUERRA et al., 1999).

De acordo com Guerra e Nodari (2006) as auxinas nos meios podem variar de 0,01 a 10 mg/L, e as mais usadas são o AIA, ácido indol-butírico (AIB), ácido naftaleno-acético (ANA) e 2,4-D, sendo que as duas últimas são sintéticas e de efeitos semelhantes às auxinas de origem natural, com a vantagem de serem mais estáveis à degradação.

O herbicida 2,4-D é uma substância sintética análoga à classe das auxinas e sua adição ao meio de cultura é um dos passos fundamentais na indução da embriogênese somática em muitas plantas cultivadas *in vitro* (DUDITS et al., 1991). De acordo com Guerra et al. (1999), na maioria dos modelos de embriogênese induzida, as auxinas, com destaque para o 2,4-D, são consideradas as substâncias

responsáveis pelo desencadeamento dos processos de desdiferenciação e rediferenciação, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes. Para Guerra e Nodari (2006), 2,4-D é bastante utilizado para a indução de calos e tem o efeito da supressão da morfogênese.

Segundo Lemes da Silva et al. (2009) na maioria das espécies em que a presença de reguladores de crescimento é necessária para desencadear o processo de iniciação da embriogênese somática, as auxinas e citocininas são as substâncias que desempenham papel principal. Dentre elas, 2,4-D é a mais utilizada em programas de embriogênese somática. Adicionalmente, a combinação de 2,4-D com cinetina é geralmente recomendada para a embriogênese somática de diversas espécies arbóreas de angiospermas e gimnospermas (PAIVA-NETO et al., 2003).

Santa-Catarina et al. (2001) observaram a indução de culturas embriogênicas em *O. odorifera* somente em meio de cultura contendo altas concentrações de 2,4-D, resultados semelhantes aos obtidos para *O. catharinensis* por Moura-Costa et al. (1993). Em seu trabalho com indução de embriogênese somática em *Araucaria angustifolia*, Guerra et al. (2000) obtiveram ótimos percentuais de indução quando utilizadas baixas concentrações de 2,4-D, ou mesmo na ausência deste regulador.

Reguladores de crescimento não influenciam respostas apenas pela mudança na concentração. A regulação também pode ser exercida através de mudança na sensibilidade da célula em responder ao estímulo, a qual pode ser influenciada pela presença de outras substâncias endógenas. Isto explica o porquê de certos explantes serem competentes para a embriogênese somática e outros não, e explantes de mesma origem, mas coletados em épocas diferentes apresentarem diferentes respostas à indução embriogenética (GUERRA et al., 1999).

3.5.3 Meio de cultura

No presente contexto e de acordo com Guerra e Nodari (2006), meios de cultura são combinações de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento que fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam em grande parte o padrão de desenvolvimento *in vitro*. A constituição dos meios de cultura deve ser baseada nas

exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais com algumas modificações visando atender necessidades específicas.

Conforme Vasil (2008) a falta de uma solução nutritiva que pudesse suportar eficientemente o crescimento de células e tecidos de plantas isolados impediu o progresso no campo da biotecnologia durante muitos anos. Na década de 20 alguns trabalhos foram realizados utilizando-se a solução mineral que Knop formulou em 1865. Nesse meio de cultura havia algum crescimento, mas as culturas não podiam ser mantidas por mais do que algumas semanas.

O norte-americano, Philip Rodney White, nas décadas de 30 e 40, concentrou seus esforços no desenvolvimento de uma solução nutritiva que pudesse suportar de forma adequada o crescimento do material vegetal e surgiu, então, o meio White. Baseado numa formulação já existente e com adição de outros elementos como glicina, ácido nicotínico, tiamina e piridoxina, este meio foi largamente utilizado durante toda a década de 60 (VASIL, 2008). Conforme Guerra e Nodari (2006) esta formulação apresentava baixos níveis de nitrogênio e potássio, o que restringia sua utilização para muitas células.

No início da década de 1960 Toshio Murashige, então estudante no laboratório de Folke Skoog, descobriu que a adição de um extrato aquoso de folhas de tabaco ao meio White resultou num aumento do crescimento do material cultivado. Isso levou à formulação de um novo e eficiente meio de cultura, o Murashige e Skoog (1962) ou meio MS, o qual continha, também, quelato de ferro para torná-lo mais estável e disponível ao longo do cultivo, mioinositóis e um complexo de vitaminas. De acordo com Guerra e Nodari (2006), uma das características deste meio de cultura está associada aos elevados teores de nitrato, potássio e amônio. É até hoje uma das formulações mais utilizadas em cultura de tecidos vegetais e a publicação que descreve o meio MS continua sendo uma das mais citadas no campo da Biologia Vegetal (VASIL, 2008). Em estudos de embriogênese somática o meio MS é o mais utilizado, tendo sido empregado com sucesso, por exemplo, por Paiva-Neto et al. (2003), Sharma et al. (2005), Moon et al. (2005) e Lemes da Silva et al. (2009) em diversas espécies arbóreas.

Os elementos essenciais encontrados em meios de cultura compreendem a água, os sais inorgânicos que visam fornecer ao meio os principais nutrientes minerais de plantas (N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Mo, Cu, Cl, Zn, Mn e Co), a fonte de carbono e energia (sacarose, glicose, frutose), uma vez que tais materiais

apresentam comportamento heterotrófico, vitaminas (riboflavina, tiamina) e substâncias reguladoras de crescimento (auxinas, citocininas, giberelinas e ácido abscísico). Outros componentes adicionais também podem ser utilizados, conforme a necessidade, tais como alguns ácidos orgânicos, aminoácidos e amidas (GUERRA e NODARI, 2006).

O nitrogênio é o principal nutriente envolvido no processo de morfogênese e diferentes concentrações e fontes deste componente no meio de cultura podem promover a indução e o desenvolvimento da embriogênese somática de diferentes maneiras (DAL-VE스코 e GUERRA, 2001; TRABELSI et al., 2003).

Diversos relatos apontam a influência e os benefícios da utilização do carvão ativado nos processos de crescimento e desenvolvimento em culturas de tecidos vegetais. O carvão ativado é utilizado para neutralizar o efeito de substâncias tóxicas e de compostos fenólicos produzidos pelo explante e liberado ao meio de cultura e que podem ser inibitórias à organogênese e à embriogênese, proporcionando um melhor crescimento e desenvolvimento do material *in vitro* (PAN e VAN-STADEN, 1998; MARUYAMA e ISHII, 1999; LEMES DA SILVA et al., 2009).

Segundo Pan e Van-Staden (1998), não apenas toxinas e substâncias inibitórias do crescimento são absorvidas pelo carvão ativado, reguladores de crescimento adicionados ao meio também podem ser seqüestrados, reduzindo sua disponibilidade. Sugere-se, portanto, em alguns casos, aumento da concentração de auxina quando na presença de carvão ativado (GUERRA e NODARI, 2006). Moura-Costa et al. (1993) elevaram em 20 vezes a concentração de 2,4-D no meio utilizado para multiplicação de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* a fim de compensar o efeito da adsorção causada pelo carvão ativado adicionado ao meio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Sementes maduras foram obtidas a partir de frutos de plantas matrizes de *O. catharinensis*, coletados em 02 de abril de 2007 no Parque Estadual da Cantareira em São Paulo - SP, e de *O. odorifera*, coletados em 23 de junho de 2007 no Parque Estadual Carlos Botelho, Município de São Miguel Arcanjo - SP. A partir dessas sementes foram obtidos os eixos embrionários, os quais foram utilizados nos experimentos de indução de embriogênese.

4.2 Assepsia

Os frutos foram submetidos a um processo de desinfecção pela imersão em etanol 70% (v/v) durante 5 minutos, água sanitária comercial 100% por 30 minutos, seguido de três lavagens com água destilada autoclavada, em câmara de fluxo laminar.

4.3. Indução da embriogênese somática

Para a indução das culturas embriogênicas os eixos embrionários de sementes maduras foram isolados e inoculados, individualmente, em tubos de ensaio contendo meio de cultura. Como meios de cultura básicos para *O. catharinensis* foram utilizados o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e o WPM (LLOYD e McCOWN, 1981). Devido à menor quantidade de sementes obtidas, em *O. odorifera* foi utilizado apenas o meio WPM. Em ambos os meios foram adicionados sacarose (30 g.L^{-1}), carvão ativado ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$), ágar (6 g.L^{-1}) e as auxinas 2,4-D e ANA, isoladamente e em diferentes concentrações (0, 9, 18, 36, 72 e 144

μM). O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121 °C, por 15 minutos a 1,5 atm.

Para cada tratamento foi inoculado um número médio de vinte e oito embriões zigóticos, no caso de *O. catharinensis*, e vinte e dois para *O. odorifera*. Ressalta-se que para *O. odorifera* foi coletado um menor número de sementes comparado à *O. catharinensis*.

A obtenção dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar, onde os frutos, após serem seccionados, tiveram seus eixos embrionários extraídos e inoculados em tubos de ensaio contendo 12 mL de meio de cultura.

Os resultados foram avaliados considerando-se o percentual de culturas que apresentaram resposta após indução nos diferentes tratamentos. Avaliou-se também a taxa de oxidação das culturas, o índice de contaminação ao longo do cultivo, além de outros parâmetros tais como a emissão da radícula e o desenvolvimento da parte aérea.

Após a inoculação no meio de cultura os eixos embrionários foram mantidos no escuro, em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C. Observações mensais foram realizadas visando analisar os diferentes parâmetros abordados.

4.4 Manutenção das culturas embriogênicas

Decorridos 180 dias da inoculação para *O. catharinensis* e 120 dias para *O. odorifera*, os materiais que apresentavam proliferação significativa de calos foram repicados e inoculados em novo meio de cultura com as mesmas condições iniciais em que foram inoculados, tanto para o tipo de meio de cultura (MS ou WPM) quanto para os reguladores de crescimento e suas respectivas concentrações.

Após 650 dias para *O. catharinensis* e 480 dias para *O. odorifera*, nova repicagem foi realizada, e todo o material remanescente foi transferido para um

único meio de cultura (WPM), contendo 144 μM de 2,4-D. Tal procedimento foi realizado visando aumentar a proliferação das culturas embriogênicas obtidas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Ocotea catharinensis*

Os explantes, constituídos pelos eixos embrionários, apresentaram diferentes respostas quando cultivados *in vitro*. A presença de calos compactos, de coloração marrom, e calos friáveis, de coloração branca, foi evidenciada em diferentes tratamentos. A obtenção de calo compacto é frequentemente observada como sendo anterior às respostas de calos embriogênicos, como observado anteriormente em *O. odorifera* (SANTA-CATARINA et al., 2001). As tabelas de 1 a 4 apresentam os dados referentes ao percentual de indução destes dois tipos de calos em culturas de *O. catharinensis* durante o cultivo.

Tabela 1: Percentual de indução de calos friáveis a partir de eixos embrionários de *O. catharinensis* inoculados em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de ANA e 2,4-D (n=28).

Regulador de crescimento	Concentração (µM)	Dias de Cultivo													
		30	60	90	120	180	210	240	450	600	650	680	710	740	770
ANA	0	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	0	0	0	0	0
	9	0	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	3,7	7,4	7,4	7,4	3,7	3,7	3,7	0	0	0	0	0	0
	144	3,6	3,6	7,1	10,7	10,7	7,1	7,1	7,1	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	0
2,4-D	0	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	3,4	3,4	6,9	6,9	6,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	144	0	0	0	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	0	0	0	0	0

Tabela 2: Percentual de indução de calos compactos a partir de eixos embrionários de *O. catharinensis* inoculados em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de ANA e 2,4-D (n=28).

Regulador de crescimento	Concentração (µM)	Dias de Cultivo													
		30	60	90	120	180	210	240	450	600	650	680	710	740	770
ANA	0	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
	9	0	0	0	0	0	0	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	0	0	0	0
	144	0	7,1	17,9	17,9	17,9	10,7	10,7	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	3,6	0
2,4-D	0	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
	9	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	0
	144	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	0	0	0	0	0

Tabela 3: Percentual de indução de calos friáveis a partir de eixos embrionários de *O. catharinensis* inoculados em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de ANA e 2,4-D (n=28).

Regulador de crescimento	Concentração (µM)	Dias de Cultivo													
		30	60	90	120	180	210	240	450	600	650	680	710	740	770
ANA	0	0	0	0	5,9	11,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	10,7	10,7	10,7	10,7	10,7	3,6	3,6	3,6	3,6	0	0	0	0	0
	36	3,4	3,4	3,4	3,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	144	0	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	0	0	0	0	0	0
2,4-D	0	0	0	0	5,9	11,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	3,6	3,6	3,6	7,1	7,1	7,1	7,1	0	0	0	0	0	0	0
	18	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	3,6	0	0	0	0	0	0
	36	3,8	3,8	3,8	7,7	7,7	7,7	3,8	3,8	3,8	0	0	0	0	0
	72	0	3,3	3,3	6,6	6,6	6,6	6,6	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	0	0
	144	17,9	21,4	21,4	21,4	21,4	21,4	21,4	17,9	14,3	10,7	10,7	7,1	3,6	3,6

Tabela 4: Percentual de indução de calos compactos a partir de eixos embrionários de *O. catharinensis* inoculados em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de ANA e 2,4-D (n=28).

Regulador de crescimento	Concentração (µM)	Dias de Cultivo													
		30	60	90	120	180	210	240	450	600	650	680	710	740	770
ANA	0	5,9	11,8	11,8	11,8	11,8	11,8	11,8	5,9	0	0	0	0	0	0
	9	0	3,3	6,7	6,7	6,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	7,1	10,7	10,7	10,7	10,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	36	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	144	0	0	0	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	0	0	0	0	0	0
2,4-D	0	5,9	11,8	11,8	11,8	11,8	11,8	11,8	5,9	0	0	0	0	0	0
	9	7,1	7,1	7,1	10,7	10,7	10,7	10,7	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
	18	0	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	0	0	0
	36	0	19,2	19,2	23,1	23,1	19,2	19,2	19,2	15,4	11,5	7,7	7,7	7,7	3,8
	72	6,7	20	20	23,3	23,3	20	20	10	6,7	6,7	3,3	3,3	0	0
	144	21,4	42,9	57,1	64,3	67,9	64,3	64,3	57,1	35,7	32,1	21,4	14,3	7,1	7,1

Na Figura 3 pode-se observar o aspecto morfológico de calos oxidados (Figura 3A) e não oxidados (Figura 3B) durante a indução. É importante ressaltar que a alta percentagem de oxidação nesta espécie é devido à presença de grande quantidade de compostos fenólicos. Entretanto, a partir deste material oxidado pode ocorrer o desenvolvimento de calos e embriões somáticos, conforme já constatado para *O. odorifera* (SANTA-CATARINA et al., 2001). A Figura 3B ilustra esta característica de formação de calos compactos claros a partir de calo oxidado.

Figura 3: Aspecto morfológico de calo oxidado (A) e não oxidado (B) originados a partir de eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio WPM acrescido de $144\mu\text{M}$ de 2,4-D.

Figura 4: Características morfológicas de calos friáveis (A) e calos compactos (B) induzidos a partir de eixos embrionários maduros de *O. catharinensis* induzidos em meio WPM acrescido de $144\mu\text{M}$ de 2,4-D.

A combinação do meio de cultura MS com o regulador de crescimento ANA proporcionou baixa resposta com relação à formação de calos compactos e friáveis. O maior percentual de indução de calos friáveis se deu no tratamento com concentração máxima do regulador de crescimento, 11% aos 120 dias de cultivo, conforme pode ser observado na Figura 5.

Com relação aos calos compactos, novamente maiores percentuais de indução foram observados quando utilizado ANA na concentração de $144\mu\text{M}$, com 18% aos 90 dias (Figura 6).

Figura 5: Percentual de indução de calos friáveis nos eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio MS sob diferentes concentrações de ANA (n=28).

Figura 6: Percentual de indução de calos compactos nos eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio MS sob diferentes concentrações de ANA (n=28).

A Figura 7 demonstra que houve um processo de oxidação acentuado ao longo dos primeiros 180 dias de cultivo para todas as concentrações de ANA utilizadas, se mantendo constante até o final do período analisado. Comparando-se as concentrações observa-se que com o aumento da concentração de ANA ocorreu uma redução na oxidação, sendo o menor percentual observado no tratamento contendo a maior concentração de ANA e os. Os maiores percentuais de oxidação foram observados nas concentrações de 0 e 18 µM com 96,6% e 100%, respectivamente.

Figura 7: Percentual da oxidação total de eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio MS sob diferentes concentrações de ANA (n=28).

O percentual de indução de calos friáveis e compactos foi muito baixo quando se utilizou meio MS combinado com o regulador de crescimento 2,4-D. A Figura 8 demonstra que o máximo de indução de calos friáveis, pouco menos de 7%, ocorreu na concentração de 72 μM, aos 90 dias. Aos 650 dias já não se observou mais este tipo de calo em nenhum dos tratamentos, uma vez que os indivíduos que apresentaram este tipo de resposta acabaram sendo descartados por oxidação ou contaminação.

Figura 8: Percentual de calos friáveis formados em eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio MS sob diferentes concentrações de 2,4-D (n=28).

Figura 9: Percentual (%) de indução de calos compactos nos eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio MS sob diferentes concentrações de 2,4-D (n=28).

No caso dos calos compactos verificou-se uma baixa taxa de indução ao longo do período analisado (Figura 9). Com exceção das concentrações de 18 μM e 36 μM , em todas as outras se observou uma resposta rápida aos 30 dias do cultivo, no entanto o percentual ficou em torno de 3,5%, valor que se manteve constante durante o cultivo.

Figura 10: Percentual da oxidação total de eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio MS sob diferentes concentrações de 2,4-D (n=28).

Na Figura 10 pode-se observar que o percentual de oxidação foi similar em todos os tratamentos, com o início da oxidação aos 30 dias de cultivo e com percentual próximo de 100% após 180 dias. Este resultado sugere que a concentração de 2,4-D não influencia a oxidação no meio de cultura MS.

Figura 11: Percentual de calos friáveis formados em eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de ANA (n=28).

A utilização do meio de cultivo WPM acrescido do regulador de crescimento ANA proporcionou baixa taxa de indução de calos friáveis e compactos, (Figuras 11 e 12). Os maiores percentuais de indução foram observados no tratamento controle, cerca de 12% de calos friáveis aos 180 dias, e o mesmo percentual de indução de calos compactos aos 60 dias. Na concentração de 18 μM de ANA o percentual máximo de calos friáveis e compactos foi de aproximadamente 11% aos 30 e 60 dias, respectivamente.

Aos 450 dias de cultivo a taxa de oxidação para todas as concentrações variou entre 80 e 100% (Figura 13) e aos 650 dias todos os exemplares já haviam sido descartados devido à oxidação total ou contaminação do material.

Figura 12: Percentual de calos compactos formados em eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de ANA (n=28).

Figura 13: Percentual da oxidação total de eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de ANA (n=28).

Uma situação interessante foi observada num embrião submetido à concentração de 36 µM o qual apresentou, aos 80 dias de cultivo, um embrião somático no estágio globular localizado no ápice de uma protuberância, sem que houvesse ocorrido indução de calos, conforme pode ser observado na Figura 14.

Figura 14: Embrião somático (setas) de *O. catharinensis* induzido em meio WPM acrescido de 36 μ M de ANA aos 80 (A), 140 (B) e 180 (C) dias de cultivo.

Em *O. catharinensis* verificou-se que os maiores percentuais de indução de calos friáveis ocorreram nos tratamentos com a maior concentração de 2,4-D em meio de cultura WPM. O percentual máximo de indução observado, 21,4%, ocorreu após 60 dias de cultivo (Figura 15).

Com relação aos calos compactos (Figura 16), observou-se que a combinação do regulador de crescimento 2,4-D no meio de cultura WPM foi fundamental para a indução desta resposta. O maior percentual foi observado no tratamento contendo a maior concentração de 2,4-D (144 μ M). Neste caso ocorreu um aumento contínuo durante os primeiros 180 de cultivo, iniciando com 21,4% após 30 dias, e atingindo 67,9 % após 180 dias.

Figura 15: Percentual de calos friáveis formados em eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de 2,4-D (n=28).

Figura 16: Características morfológicas de calos compactos induzidos a partir de eixos embrionários maduros de *O. catharinensis*, após 30 (A), 60 (B), 90 (C) e 180 dias (D) em meio de cultura WPM contendo 144 μM de 2,4-D. As setas indicam o local de indução de calos compactos.

Analisando as figuras 15, 17 e 18 nota-se a relação inversa entre as taxas de indução e a taxa de oxidação. Sob concentração de 144 μM , onde houve maior taxa de indução de calos friáveis e compactos, ocorreu um menor índice de oxidação, da ordem de 30%. Por outro lado, na ausência de regulador e na concentração de 18 μM onde o percentual de oxidação dos explantes foi mais elevado (90 e 75%, respectivamente), houve também uma menor taxa de indução. Este fato sugere que a baixa taxa de oxidação, especialmente na concentração de 144 μM de 2,4-D, deve-se, provavelmente, ao elevado percentual de indução de calos.

Figura 17: Percentual de calos compactos formados em eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de 2,4-D (n=28).

Figura 18: Percentual da oxidação total de eixos embrionários de *O. catharinensis* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de 2,4-D (n=28).

Tal como verificado num dos eixos embrionários induzidos em meio WPM suplementados com 36 µM de ANA, embriogênese direta também foi observada em um dos indivíduos inoculados em meio de cultura WPM acrescido de 72 µM de 2,4-D. Verificou-se o desenvolvimento de uma estrutura globular no ápice do eixo embrionário. Porém, ao contrário da estrutura observada no outro tratamento, neste a estrutura se desenvolveu, possivelmente em estádios de desenvolvimento subseqüentes, conforme pode ser observado na sequência da Figura 19.

Figura 19: Embrião somático (setas) de *O. catharinensis* induzido em meio WPM suplementado com 72 µM de 2,4-D aos 40 (A), 100 (B) e 190 (C) dias de cultivo.

A Tabela 5 indica que em *O. catharinensis*, a combinação do meio de cultura WPM suplementado com 2,4-D mostrou-se mais efetiva na indução de calos compactos. Os resultados mais expressivos foram observados no tratamento contendo 2,4-D na concentração de 144 µM. Por outro lado, os menores percentuais

de indução foram obtidos no meio MS suplementado com 2,4-D, em todas as concentrações, verificando-se alta taxa de oxidação dos eixos embrionários inoculados. Em meio MS resposta significativa foi observada apenas na combinação com 144 μM de ANA.

Ao comparar os explantes cultivados nos dois diferentes meios de cultura pode-se verificar que aqueles inoculados no meio MS apresentaram um aumento no percentual de oxidação para todas as concentrações até 90 dias de cultivo (Figuras 7 e 10), enquanto os explantes em meio WPM apresentaram um aumento a partir de 90 e 120 dias (Figuras 13 e 18). Este resultado sugere que o meio MS pode estar relacionado com um aumento da oxidação no início do cultivo e no meio WPM, esta oxidação é maior a partir de 90 a 120 dias de cultivo dos explantes. Este fato pode estar relacionado a algum componente presente em maior quantidade no meio MS, nitrogênio, possivelmente.

Tabela 5: Percentuais totais dos parâmetros analisados durante o cultivo de eixos embrionários de *O. catharinensis* (n=28).

Meio de Cultura	Regulador de Crescimento	Concentração (μM)	Calos Friáveis	Calos Compactos	Calos Totais	Oxidação	Contaminação
MS	ANA	0	3,4	3,4	3,4	96,6	6,8
		9	3,7	3,7	3,7	81,5	22,2
		18	0	0	0	100	0
		36	0	0	0	85,2	14,8
		72	7,4	3,7	7,4	85,2	14,8
		144	10,7	17,9	21,4	60,7	39,3
	2,4-D	9	0	3,6	3,6	96,4	3,6
		18	0	0	0	100	0
		36	0	0	0	100	0
		72	6,9	3,4	6,9	96,6	3,4
		144	3,3	3,3	3,3	96,7	3,3
WPM	ANA	0	11,8	11,8	17,6	88,2	23,5
		9	0	6,7	6,7	96,7	3,3
		18	10,7	10,7	14,3	96,4	10,7
		36	3,4	3,4	6,8	93,1	17,2
		72	0	0	0	96,2	11,5
		144	3,6	3,6	3,6	82,1	25
	2,4-D	9	7,1	10,7	10,7	60,7	39,3
		18	7,1	3,6	10,7	75	25
		36	7,7	23,1	30,8	65,4	34,6
		72	6,6	23,3	23,3	63,3	36,6
		144	32,1	67,9	71,4	28,6	67,9

Adicionalmente foram analisados parâmetros relacionados ao desenvolvimento do eixo embrionário, tais como emissão da radícula e evolução da parte aérea (Tabela 6). Observa-se que no meio WPM ocorreu, de forma geral, maior desenvolvimento dos embriões, tanto no que se refere à emissão da radícula quanto na formação da parte aérea.

Tabela 6: Percentuais de desenvolvimento da parte aérea e emissão da radícula em eixos embrionários de *O. catharinensis* cultivados em meio MS e WPM sob diferentes concentrações de ANA e 2,4-D (n=28).

Meio de Cultura	Regulador de Crescimento	Concentração (μ M)	Radícula	Parte aérea
MS	ANA	0	10,3	6,9
		9	7,4	18,5
		18	3,6	10,7
		36	18,5	18,5
		72	7,4	3,7
		144	14,3	7,1
	2,4-D	9	0	0
		18	7,1	3,6
		36	0	0
		72	6,9	3,4
		144	3,3	6,7
WPM	ANA	0	23,5	29,4
		9	13,3	10
		18	25	17,9
		36	20,7	10,3
		72	3,8	3,8
		144	17,9	0
	2,4-D	9	17,9	14,3
		18	10,7	10,7
		36	11,5	11,5
		72	16,7	13,3
		144	10,7	7,1

Com relação ao regulador de crescimento utilizado, ANA foi mais efetivo no desenvolvimento do eixo embrionário se comparado ao 2,4-D, mas os maiores percentuais foram observados no meio WPM desprovido de auxina com 23,5% de emissão de radícula e 29,4% de desenvolvimento da parte aérea. Este resultado sugere que para o desenvolvimento ou germinação de embriões zigóticos pode-se optar pela utilização de meio de cultura WPM desprovido de auxinas.

Figura 20: Percentual (%) de contaminação de embriões de *O. catharinensis* induzidos em meio MS sob diferentes concentrações de ANA (n=28).

Figura 21: Percentual (%) de contaminação de embriões de *O. catharinensis* induzidos em meio MS sob diferentes concentrações de 2,4-D (n=28).

Figura 22: Percentual (%) de contaminação de embriões de *O. catharinensis* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de ANA (n=28).

Figura 23: Percentual (%) da contaminação de embriões de *O. catharinensis* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de 2,4-D (n=28).

5.2 *Ocotea odorifera*

Nas Tabelas 7 e 8 estão representados os dados referentes aos percentuais de indução de calos compactos e friáveis em *O. odorifera*. Devido ao reduzido número de frutos coletados para esta espécie, e pela resposta inicial observada com *O. catharinensis* optou-se por não realizar o ensaio utilizando-se o meio de cultura MS.

Tabela 7: Percentual de indução de calos friáveis a partir de eixos embrionários de *O. odorifera* inoculados em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de ANA e 2,4-D (n=22).

Regulador de crescimento	Concentração (µM)	Dias de cultivo													
		30	60	100	140	170	230	380	520	580	600	630	560	690	
ANA	0	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	18,8	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	
	9	5,3	5,3	10,5	10,5	10,5	15,8	0	0	0	0	0	0	0	
	18	0	0	0	0	0	0	0	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	
	36	9,1	9,1	9,1	9,1	0	0	0	4,5	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1	
	72	0	10	10	10	10	10	25	25	25	20	20	20	10	
	144	5	15	15	20	20	25	20	35	35	35	35	40	40	
2,4-D	0	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	18,8	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	
	9	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	18	19	23,8	23,8	23,8	23,8	23,8	14,3	14,3	9,5	9,5	9,5	9,5	14,3	
	36	11,1	11,1	11,1	16,7	16,7	16,7	16,7	27,8	33,3	27,8	33,3	33,3	33,3	
	72	0	0	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	15,8	15,8	
	144	10,5	15,8	15,8	21,1	21,1	21,1	15,8	36,8	36,8	36,8	36,8	36,8	31,6	

Os maiores percentuais de indução de calos friáveis foram observados em meio contendo ANA na concentração máxima (144 μM), iniciando com 5% aos 30 dias de cultivo e aumentando gradativamente até atingir 40% aos 570 dias (Tabela 7).

Tabela 8: Percentual de indução de calos compactos a partir de eixos embrionários de *O. odorifera*, inoculados em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de ANA e 2,4-D (n=22).

Regulador de crescimento	Concentração (μM)	Dias de Cultivo												
		30	60	100	140	170	230	380	520	580	600	630	560	690
ANA	0	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	5,3	5,3	10,5	10,5	10,5	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	0
	18	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3
	36	0	9,1	9,1	13,6	18,2	18,2	13,6	27,3	27,3	27,3	22,7	22,7	18,2
	72	5	5	15	20	20	20	25	25	25	20	20	15	10
	144	0	10	10	15	20	20	40	40	40	40	40	40	40
2,4-D	0	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	36	5,55	5,55	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	33,3	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
	72	0	0	10,5	10,5	10,5	10,5	0	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5
	144	5,3	15,8	10,5	15,8	15,8	15,8	15,8	47,4	42,1	36,8	36,8	36,8	31,6

Com relação à indução de calos compactos, maiores percentuais foram observados também nos tratamentos em que se utilizou ANA na concentração de 144 μM e o percentual máximo de indução foi de 40% de calos compactos aos 520 dias de cultivo, número que se manteve constante nas observações posteriores (Tabela 8).

Comparando as figuras 24, 25 e 26 observa-se a relação inversa entre as taxas de oxidação e de indução. Maior percentual de embriões oxidados foi observado na concentração de 9 μM , cerca de 85% aos 520 dias, sendo que este tratamento apresentou também os menores percentuais de indução de calos, máximo de 15% aos 230 dias, com posterior redução desses valores. Por outro lado, na concentração de 144 μM onde houve maior percentual de indução, a taxa de oxidação máxima foi de 40% aos 520 dias.

Figura 24: Percentual de calos friáveis formados em eixos embrionários de *O. odorifera* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de ANA (n=22).

Figura 25: Percentual de calos compactos formados em eixos embrionários de *O. odorifera* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de ANA (n=22).

Figura 26: Percentual de oxidação total de eixos embrionários de *O. odorifera* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de ANA (n=22).

No meio contendo 2,4-D o maior percentual de indução foi observado na concentração de 144 μM , com 36,8% de calos friáveis e 47,4% de calos compactos aos 520 dias, valores que permaneceram constantes nas observações posteriores. Destaque para a concentração de 36 μM , atingindo o máximo de 33,3% de calos compactos aos 580 dias (Figuras 27 e 28).

Figura 27: Percentual de calos friáveis formados em eixos embrionários de *O. odorifera* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de 2,4-D (n=22).

Figura 28: Percentual de calos compactos formados em eixos embrionários de *O. odorifera* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de 2,4-D (n=22).

Aparentemente, nesta espécie, mais importante do que o tipo do regulador de crescimento foi sua concentração. Maiores percentuais de calos foram observados em concentrações mais elevadas desses reguladores. De uma forma geral, assim como na espécie anterior, o meio de cultura WPM suplementado com 2,4-D foi mais efetivo na indução de calos. Entretanto, em *O. odorifera* a combinação WPM+ANA

mostrou-se bastante efetiva também, ao contrário do observado em *O. catharinensis*, onde os resultados foram pouco expressivos.

Figura 29: Percentual da oxidação total de eixos embrionários de *O. odorifera* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de 2,4-D (n=22).

Foi observada, também, a formação de estruturas globulares que evoluíram e passaram a formar calos claros, compactos, de aparência gelatinosa como os que podem ser observado na Figura 30. Este tipo de calo ainda não havia sido observado nesta espécie ao longo de todo o cultivo e, após a repicagem realizada aos 580 dias em meio WPM acrescido por 144 µM de 2,4-D, passaram a proliferar.

Figura 30: Calos compactos de aspecto gelatinoso em eixos embrionários de *O. odorifera* induzidos em meio WPM suplementado com 144 µM de 2,4-D.

Em *O. odorifera* os percentuais de indução foram superiores aos obtidos com *O. catharinensis*. Isso pode estar relacionado ao fato de que os frutos de *O. catharinensis* utilizados encontravam-se em estágio mais avançado de desenvolvimento que os de *O. odorifera*. Santa-Catarina et al. (2001) testaram a indução de embriogênese somática em *O. odorifera* utilizando embriões zigóticos em diferentes estádios de desenvolvimento e constataram que somente embriões

provenientes de sementes coletadas a partir de 150 dias após a floração apresentaram potencial de indução, sendo que os melhores resultados foram obtidos com embriões um pouco mais maduros, coletados entre 240 e 300 dias após a floração. Diversos autores apontam o emprego de embriões zigóticos imaturos ou semi maduros como sendo mais efetivos na indução da embriogênese somática (WATT et al., 1999; GUERRA et al., 2000; SANTA-CATARINA et al., 2001; PAIVANETO et al., 2003; MARTIN e MADASSERY, 2005; AGRAWAL e SARDAR, 2007).

Da mesma forma, foram menores os índices de oxidação e contaminação. Pode-se sugerir que a sobrevivência do material esteve diretamente relacionada com a capacidade de formação de calos, uma vez que os indivíduos oxidados ao longo do cultivo geralmente foram aqueles que não apresentaram resposta à indução. A Tabela 9 apresenta os percentuais totais dos parâmetros observados.

Tabela 9: Percentuais máximos dos parâmetros analisados durante o cultivo de eixos embrionários de *O. odorifera* (n=22).

Regulador de Crescimento	Concentração (µM)	Calos Friáveis	Calos Compactos	Calos Totais	Oxidação	Contaminação
ANA	0	18,8	6,3	18,8	62,5	25
	9	15,8	10,5	15,8	84,2	15,8
	18	9,5	14,3	14,3	66,7	19
	36	18,2	31,8	31,8	63,6	22,7
	72	25	30	30	45	35
	144	40	40	40	40	15
2,4-D	9	5	0	5	90	10
	18	23,8	0	23,8	81	4,7
	36	38,9	33,3	38,9	61,1	5,5
	72	26,3	26,3	31,6	68,4	10,5
	144	47,4	52,6	57,9	47,4	15,8

Na Tabela 10 estão representados os valores referentes à emissão da radícula e desenvolvimento da parte aérea dos embriões. Tal como observado na espécie *O. catharinensis*, os maiores percentuais ocorreram na ausência de auxina com 68,8% de emissão de radícula e 50% de desenvolvimento da parte aérea. Nos dois parâmetros observados nota-se uma redução nos valores conforme o aumento da concentração do regulador de crescimento, independentemente do tipo do regulador utilizado.

Tabela 10: Percentuais de desenvolvimento da parte aérea e emissão da radícula em eixos embrionários de *O. odorifera* cultivados em meio WPM sob diferentes concentrações de ANA e 2,4-D (n=22).

Regulador de Crescimento	Concentração (µM)	Radícula	Parte aérea
ANA	0	68,8	50
	9	57,9	42,1
	18	23,8	28,6
	36	22,7	27,3
	72	20	15
	144	10	10
2,4-D	9	45	45
	18	38,1	38,1
	36	27,8	16,7
	72	31,6	31,6
	144	26,3	31,6

Figura 31: Percentual da contaminação de eixos embrionários de *O. odorifera* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de ANA (n=22).

Figura 32: Percentual (%) da contaminação de eixos embrionários de *O. odorifera* induzidos em meio WPM sob diferentes concentrações de 2,4-D (n=22).

Observou-se que a maior taxa de indução de calos compactos, para ambas as espécies estudadas, ocorreu no tratamento contendo 144 μM de 2,4-D. Estes resultados coincidem com os obtidos por Santa-Catarina et al. (2001) que observaram a indução de culturas embriogênicas em *O. odorifera* somente em meio de cultura contendo altas concentrações de 2,4-D, resultados semelhantes aos obtidos para *O. catharinensis* por Moura-Costa et al. (1993).

Os maiores percentuais de indução observados com o regulador de crescimento 2,4-D devem-se ao fato deste consistir numa auxina sintética forte, mais potente para a indução, e confirmam as observações de Guerra et al. (1999), Guerra e Nodari (2006) e Lemes da Silva et al. (2009). O baixo percentual de indução quando se utilizaram menores concentrações do regulador pode estar relacionado ao “seqüestro” pelo carvão ativado, conforme o proposto por Pan e Van-Staden, (1998).

Como visto, são diversos fatores envolvidos no processo de embriogênese, composição do meio, tipo e concentração do regulador de crescimento, tipo e estágio de desenvolvimento do explante (LITZ et al., 1998; CHALUPA, 1999; CARNEROS et al. 2009; PRAKASH e GURUMURTHI, 2009). Até mesmo a posição do explante no meio de cultura pode influenciar a indução da embriogênese somática. Ramarosandratana e Van Staden (2003) seccionaram embriões zigóticos maduros em quatro partes e testaram cada uma dessas partes em diferentes orientações no meio de cultura na indução da embriogênese somática e constataram que para a espécie estudada, a chamada Zona 2, ou hipocótilo superior (imediatamente abaixo da região meristemática) foi mais responsiva à embriogênese somática, sobretudo quando colocada na posição ápice para cima. Menores taxas de indução foram observadas quando o explante foi colocado horizontalmente sobre o meio de cultura. Ressalta-se que no presente trabalho os explantes foram depositados horizontalmente sobre o meio. Em estudos futuros esta observação deverá ser considerada.

Por outro lado, nas condições em que foi conduzido o experimento, não ocorreu a formação de embriões somáticos a partir dos calos obtidos (embriogênese indireta), mesmo quando os calos foram transferidos para um novo meio, desprovido da auxina, ou na sua concentração máxima. Moon et al. (2005) induziram calos

embriogênicos a partir de embriões zigóticos imaturos de *Kalopanax pictus* cultivados em meio MS contendo baixas concentrações de 2,4-D. Os embriões somáticos somente foram observados após a transferência desses calos para meio MS sem 2,4-D. Talvez o grande intervalo de tempo das subculturas tenha inibido a indução da embriogênese somática indireta, uma vez que os relatos indicam subculturas com intervalo de tempo variando entre 3 a 6 semanas (CORREDOIRA et al., 2008; MOON et al., 2005; SHARMA et al., 2005), ao passo que no presente trabalho as primeiras subculturas ocorreram aos 180 dias (*O. catharinensis*) e 120 dias (*O. odorifera*), e uma segunda repicagem realizada aos 650 dias para *O. catharinensis* e 580 dias para *O. odorifera*.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi conduzido o experimento pode-se concluir que altas concentrações do regulador de crescimento 2,4-D são mais efetivas na indução de calos compactos em ambas as espécies estudadas.

Em *O. catharinensis* o meio de cultura MS suplementado com 2,4-D proporcionou elevado índice de oxidação dos eixos embrionários, possivelmente devido a algum componente do meio de cultura presente em grande quantidade, comparado ao meio WPM.

De uma forma geral, *O. odorifera* respondeu melhor às induções. O regulador ANA apresentou melhores percentuais de indução quando comparado com *O. catharinensis*, porém não foi possível concluir se este fato está relacionado ao genótipo ou ao estágio de maturação dos eixos embrionários.

Nesta fase foi possível estabelecer as condições de indução de calos compactos. Sabendo-se que as espécies estudadas respondem melhor sob concentrações mais elevadas de 2,4-D em meio WPM já é um ponto de partida para estudos futuros que poderão focar nestas condições testando outras variáveis para melhor elucidar os mecanismos que promovem a embriogênese somática na espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGRAWAL, V.; SARDAR, P. R. *In vitro* regeneration through somatic embryogenesis and organogenesis using cotyledons of *Cassia angustifolia* Vahl. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, vol. 43, p. 585-592, 2007.

ATTREE, S. M.; FOWKE, L. C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. **Plant Cell Tissue Org. Cult.**, vol. 35, p. 1-35, 1993.

CARNEROS, E.; CELESTINO, C.; KLIMASZEWSKA, K.; PARK, Y. S.; TORIBIO, M.; BONGA, J. M. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, vol. 98, p. 167-178, 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPACNPQ/SPI, 1994.

CHALUPA, V. Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp.). In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J (ed) **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 5, p. 31-43, 1999.

CORREDOIRA, E.; VALLADARES, S.; VIEITEZ, A. M.; BALLESTER, A. Improved germination of somatic embryos and plant recovery of European chestnut. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, vol. 44, p. 307-315, 2008.

CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, F. J.; VIEITEZ, A. M. Somatic embryogenesis in chestnut. In: MUJIB, A., SAMAJ, J. (ed). **Plant Cell Monographs**, vol. 2, Somatic Embryogenesis. Berlin: Springer, p. 177-199, 2006.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, vol. 64, p. 19-25, 2001.

DHEKNEY, S. A.; LI, Z. T.; DUTT, M.; GRAY, D. J. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cultures and plant regeneration in *Vitis rotundifolia* Michx. (muscadine grape). **Plant Cell Rep.**, vol. 27, p. 865-872, 2008.

DUDITS D.; BOGRE L.; GYORGYEY J. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro. **J. Cell. Sci.**, v. 99, p. 473-482, 1991.

DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotech. Gen. Eng. Rev.**, v. 6, p. 341-378, 1988.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

FUNASAKI, M.; LORDELLO, A. L. L.; VIANA, A. M.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E. I. S.; YOSHIDA, M.; KATO, M.J. Neolignans and sesquiterpenes from leaves and embryogenic cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20 (5), p. 853-859, 2009.

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.

FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese *in vitro*. **Rev. Bras. Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 1992-2001, 2007.

GOLDBERG, R. B.; DE PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis: zygote to seed. **Science**, 266, p. 605-614, 1994.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Apostila de biotecnologia, 2006.

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; DOS SANTOS, A. L. W.; ASTARITA, L. V.; NODARI, R. O. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. v. 6, p. 457-478.

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, 1999. v. 2, p. 533-568.

JAIN, S. M.; ISHII, K. Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. In: Recent advances. In: MANTELL, S.H.; BRUNS, S.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. (Ed.). **Recent advances in biotechnology for conservation and management**. Stockholm: International Foundation for Science, 1998. p. 214-231.

LEMES DA SILVA, M.; PINTO, D. C. P.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. Y. S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 99, p. 47-54, 2009.

LIMA, A. R.; CAPOBIANCO, J. P. R. Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para sua conservação. **Documentos do ISA**, n. 4, p. 5-7, 1997.

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**, Stockholm: International Foundation for Science, 1998. p. 232-243.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Int. Plant Prop. Soc. Proc.**, v. 30, p. 421-427, 1981.

LORDELLO, A.L.L. **Constituintes químicos de folhas e culturas de células e tecidos de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. vl. 1, 5^a ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 218-220, 2008.

MARTIN, K. P.; MADASSERY, J. Direct and indirect somatic embryogenesis on cotyledon explants of *Quassia amara* L., an antileukaemic drug plant. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 41, p. 54-57, 2005.

MARUYAMA, E.; ISHII, K. Somatic embryogenesis in Big-leaf Mahogany (*Swietenia macrophylla* King.) *In*: JAIN, S.; GUPTA, P.; NEWTON, R. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants.** Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. v.5, p. 45-62.

MAXIMOVA, S. N.; YOUNG, A.; PISHAK, S.; GULTINAN, M. J. Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 44, p. 487-493, 2008.

MERKLE, S. A.; DEAN, J. F. D. Forest biotechnology. **Cur. Opin. Biotech.**, v. 11, p. 298-302, 2000.

MERKLE, S. A.; NAIRN, C. J. Hardwood tree biotechnology **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 41, p. 602–619, 2005.

MOON, H. -K.; KIM, Y. -W.; LEE, J. -S.; CHOI, Y. -E. Micropropagation of *Kalopanax pictus* tree via somatic embryogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 41, p. 303-306, 2005.

MORAES, F. M. S. **Análise proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

MOURA-COSTA, P. M.; VIANA, A. M.; MANTELL, S. H. In vitro plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae), an endangered forest tree. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 35, p.279-286, 1993.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium from rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant**, v. 15, p. 437-497, 1962.

NEHRA, N. et al. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 41, p. 701–717, 2005.

OTHMANI, A.; BAYOUDH, C.; DRIRA, N.; MARRAKCHI, M.; TRIFI, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous) is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 97, p. 71-79, 2009.

PAIVA NETO, V. B.; BOTELHO, M. N.; AGUIAR, R.; SILVA, E. A. M.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 39, p. 629-634, 2003.

PAN, M. J.; VAN-STADEN, J. The use of charcoal *in vitro* culture review. **Plant Growth Reg.**, v. 26, p. 155-163, 1998.

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

PERERA, P. I. P.; VIDHANAARACHCHI, V. R. M.; GUNATHILAKE, T. R.; YAKANDAWALA, D. M. D; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; WEERAKOON, L. K. Effect of plant growth regulator on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 99, p. 73-81, 2009.

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Effects of type of explants and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 2009. In press.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell Tiss Org. Cult.**, v. 86, p. 285–301, 2006.

RAMAROSANDRATANA, A. V.; VAN-STADEN, J. Tissue position, explant orientation and naphtalene acetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruce (*Picea abies*). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 74, p. 249-255, 2003.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto madeira de Santa Catarina. SUDESUL/IBDF, Itajaí, 1978.

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, C. Da S.; PEDROTTI, E. L. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.). **Rev. Bras. Bot.**, v. 24 (4), p. 501-510, 2001.

SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L. R.; DORNELAS, M. C.; VIANA, A. M.; FLOH, E. I. S. SERK gene homolog expression polyamines and amino acids associated with somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* Mez. (*Lauraceae*). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 79, p. 53-61, 2004.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; BALBUENA, T. S.; VIANA, A. M.; ESTELITA, M.E.M.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. **Plant Growth Reg.**, v. 49, p. 237-247, 2006.

SHARMA, P.; KOCHER, V.; QURAISHI, A.; MISHRA, S. K. Somatic embryogenesis in *Buchanania lanzan* spreng. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 41, p. 645-647, 2005.

SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais, São Paulo: Editora SENAC, 2002. p. 85-101.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: **XI Symposia of the Society for Experimental Biology: the biological action of growth substance**, p. 118-132, 1957.

SLIWINSKA, A.; OLSZOWSKA, M.; FURMANOWA, M.; NOSOV, A. Rapid multiplication of *Polyscias filicifolia* by secondary somatic embryogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 44, p. 69-77, 2008.

SRISKANDARAJAH, S.; LUNDQUIST, P. -O. High frequency shoot organogenesis and somatic embryogenesis in juvenil and adult tissues of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 2009. In press.

STASOLLA, C.; YEUNG, E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 74 (1), p. 15-35, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAUTORUS, T. E.; FOWKE, L. C.; DUNSTAN, D. I. Somatic embryogenesis in conifers. **Can. J. Bot.**, v. 69, p. 1873-1899, 1991.

TORIBIO, M.; FERNANDÉZ, C.; CELESTINO, C.; MARTINEZ, M. T.; SAN-JOSÉ, M. C.; VIEITEZ, A. M. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, v. 76, p. 283-287, 2008.

TRABELSI, E. B.; BOUZID, S.; BOUZID, M.; ELLOUMI, N.; BELFELEH, Z.; BENABDALLAH, A.; GHEZEL, R. *In vitro* regeneration of olive tree by somatic embryogenesis. **Journal of Plant Biology**, v. 46(3), p. 173-180, 2003.

TROCH, V.; WERBROUCH, S.; GEELLEN, D.; LABEKE, M.- C. V. Optimization of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryo conversion. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 98, p. 115-123, 2009.

VASIL, I. K. A brief history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. **Plant Cell Rep.**, v. 27, p. 1423-1440, 2008.

VIANA, A. M. Somatic embryogenesis in *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). In: BRUNS, S.; MANTELL, S.H.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. (Ed.) **Proceedings of the IFS Workshop on Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Managemant**. Stockholm: International Foundation for Science, 1998. p. 244-253.

VIANA A. M; MAZZA, M.C.; MANTELL, S. H. Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian Rain Forest. In: BENSON, E. (Ed.) **Plant conservation biotechnology** Dundee: University of Abertay, 1999. p. 277-299.

VIANA, A. M.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E. I. S.; BOUSON, Z. L.; MOSER, J. R. Protocol of somatic embryogenesis: *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (Ed.). **Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, Dordrecht: Springer, 2005. p. 427-443.

VIANA, A. M.; MANTELL, S. H. Somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*: an endangered tree of the Mata Atlântica (South Brazil). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. v. 5, p. 3-30.

VIANA, A. M.; MAZZA, M. C. E MANTELL, S. H. Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from brazilian Rain Forest. **Plant conservation biotechnology**, p. 277-299, 1999.

WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; TERMIGNONI, R.; JAIN, S. M. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunni*. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. v. 5, p. 63-78.

WITJAKSONO, R. E.; LITZ, R. E.; PLIEGO-ALFARO, F. Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana* Mill.). In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J (ed) **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999, v. 5, p. 197-214.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic Embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant cell**, v. 5, p. 1.411-1.423, 1993.

ANEXOS

ANEXO A - Composição do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962)

Nitrato de amônio (NH_4NO_3)	1,650mg/l
Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	440mg/l
Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370mg/l
Fosfato de potássio (KH_2PO_4)	170mg/l
Nitrato de potássio (KNO_3)	1,900mg/l
Ácido bórico (H_3BO_3)	6.2mg/l
Cobalto Cloreto de ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025mg/l
Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025mg/l
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.8mg/l
Sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22.3mg/l
Iodeto de potássio (KI)	0.83mg/l
Molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25mg/l
Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ^c	8.6mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ^a	37.2mg/l ^b
mio-inositol	100mg/l
Ácido nicotínico	0.5mg/l
Piridoxina*HCl	0.5mg/l
Tiamina *HCl	0.1mg/l

Fonte: <http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/database/media/mssalts.html>

ANEXO B - Composição do meio de cultura WPM (LLOYD e McCOWN, 1981)

Nitrato de amônio	400 mg/L
Ácido bórico	6.2 mg/L
Cloreto de cálcio	72.5 mg/L
Nitrato de cálcio	386 mg/L
Sulfato de cobre•5H ₂ O	0.25 mg/L
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37.3 mg/L
Sulfato ferroso•7H ₂ O	27.85 mg/L
Sulfato de magnésio, Anidro	180.7 mg/L
Sulfato de manganês•H ₂ O	22.3 mg/L
Ácido molibdênico•2H ₂ O	0.25 mg/L
Fosfato de potássio, Monobásico	170 mg/L
Sulfato de potássio	990 mg/L
Sulfato de zinco•7H ₂ O	8.6 mg/L
Glicina	2 mg/L
mio-Inositol	100 mg/L
Acido Nicotínico	0.5 mg/L
Piridoxina•HCl	0.5 mg/L
Tiamina•HCl	1 mg/L

Fonte: <http://www.phytotechlab.com/TechInfo/L449-info.pdf>