

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO



LUCIANA LUIZA PELEGRINI

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Ocotea porosa* (NEES & MART.) BARROSO
(IMBUÍA)

CURITIBA

2012

LUCIANA LUIZA PELEGRINI

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Ocotea porosa* (NEES & MART.) BARROSO
(IMBUIA)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Marguerite G.G. Quoirin
Co-orientadora: Luciana L. F. Ribas

CURITIBA

2012

P381 Pelegrini, Luciana Luiza
Embriogênese somática de *ocotea porosa* (Ness & Mart.)
Barroso (Imbuia) / Luciana Pelegrini Luiza. – Curitiba, 2012
96 f.

Orientador: Marguerite G.G. Quoirin

Co-orientador: Luciana L. F. Ribas

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal
do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Agronomia – Produção Vegetal

1. Embriogênese somática. 2. Espécies florestais.
- I. Quoirin, Marguerite G. G.. II. Ribas, Luciana L. F.
- III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal.
- IV. Título

CDU 502.7



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a argüição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata **LUCIANA LUIZA PELEGRINI**, sob o título "**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Ocotea porosa* (NEES & MART.) BARROSO (IMBUIA)**", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese.

Curitiba, 29 de Fevereiro de 2012.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa

Professora Dra. Neusa Steiner
Primeira Examinadora

Dra. Juliana Degenhardt-Goldbach
Segunda Examinadora

Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Terceiro Examinador

Professor Dr. Luciana Lopes Fortes Ribas
Quarta Examinadora

Professora Dra. Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin
Presidente da Banca e Orientadora

Aos meus amados pais Pedro e Sueli, que me deram a vida e me ensinaram a viver com dignidade; que se doaram inteiramente e muitas vezes renunciaram aos seus sonhos em meu nome.

Ao meu irmão Maurício e minha irmã Ana Claudia, pelo carinho que sempre me dedicaram.

Amo muito vocês!!!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradecer é um privilégio! Mas só podemos agradecer por aquilo que vivenciamos e nos foi válido. Não importa o quão duro foi, mas valeu cada passo dado e cada minuto vivido. E é por esses e outros motivos que agradeço:

Deus, pela vida e proteção. Por me dar força para superar os obstáculos, por substituir em mim as incertezas em segurança, o medo pela coragem e permitir a concretização de mais um sonho.

À Professora Dra. Marguerite Quoirin pela orientação e dedicação e principalmente por ter me aceitado como orientada. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos.

À Professora Dra. Luciana Ribas, pela valiosa co-orientação deste trabalho, obrigada pelo incentivo e ensinamentos transmitidos.

À professora Dra Erika Amano, pela parceria e auxílio nos estudos de anatomia, obrigada também pelo seu incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Ao REUNI pelo suporte financeiro.

À minha família, por todo amor, dedicação, incentivo que me possibilitaram chegar até aqui. Amo vocês eternamente.

À querida amiga Elis Borcioni, pela amizade e companheirismo. Obrigada por tudo, pelos momentos bons que tivemos nestes quatro anos de caminhada e também por aqueles não tão bons assim, mas que de alguma forma nos fortaleceram.

Aos queridos amigos do Laboratório de Micropropagação João Padilha, Rafaella Mattia, Danielle Ferreira, Rodrigo Cordeiro, Leandro Oliveira, Cristiana Batista Franceschi, Silva Almeida dos Santos, Ana Paula Motta, Tatiana Mazon, Samuel Schwaida, Bruno Gobarra, Daiane Borguezine, Rorai Neto. Obrigada pelo carinho e companheirismo.

Aos professores e funcionários da Fitotecnia e Fitossanitarismo da UFPR.

Ao laboratório de Anatomia Vegetal pela disponibilidade do espaço, equipamentos e etc. Especialmente ao técnico de laboratório Nilson pela sua indispensável ajuda.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma ou de outra contribuíram para minha formação e para que este trabalho se concretizasse.

A todos vocês o meu MUITO OBRIGADO!!!

BIOGRAFIA

Luciana Luiza Pelegrini, filha de Pedro Pelegrini e Sueli Maria Broll Pelegrini, nasceu em 21 de junho de 1982, na cidade de Mamborê, estado do Paraná. Graduada em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharel) em 8 de agosto de 2005 pela Universidade Paranaense – UNIPAR, campus Cascavel. Em 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela Universidade Federal do Paraná na linha de pesquisa Estrutura e Fisiologia do desenvolvimento Vegetal, área de concentração Aplicação dos reguladores vegetais em biotecnologia vegetal e obteve o título de mestre em 11 de fevereiro de 2008, com a dissertação intitulada “Micropropagação de *Ocotea porosa* (Nees ex Martius) Liberato Barroso”.

Em Março de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Produção Vegetal pela Universidade Federal do Paraná na linha de pesquisa Morfogênese e Biotecnologia de Plantas e, em 29 de fevereiro de 2012 obteve o título de doutora em Ciências com a tese intitulada “Embriogênese somática de *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso”.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar o melhor tipo de explante, o tipo e a concentração adequada de reguladores vegetais e aminoácidos para induzir a formação de embriões somáticos de *Ocotea porosa*, estabelecer ciclos repetitivos de embriogênese somática e estudar o efeito de diferentes reguladores vegetais e agentes osmóticos na maturação e conversão de embriões somáticos. Observou-se que, nos explantes obtidos a partir de inflorescências, discos foliares, pecíolos, gemas apicais e eixos embrionários zigóticos maduros, não houve indução de embriões somáticos. A indução de massa embriogênica e embriões somáticos ocorreu em eixos embrionários zigóticos imaturos e sementes inteiras imaturas. Em meio de cultura WPM com 200 μM de 2,4-D e 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada ou glutamina, 8,3% dos eixos embrionários zigóticos imaturos formaram embriões somáticos. Em sementes inteiras imaturas cultivadas nas mesmas condições, variou de 10 a 24%. Os eixos embrionários zigóticos imaturos cultivados em meio de cultura WPM contendo 2,4-D apresentou maior porcentagem de indução de embriões somáticos comparado com a adição de ANA ou picloram. Durante a manutenção de culturas embriogênicas por meio da embriogênese repetitiva, a adição de 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada no meio de cultura WPM induziu em média 61,8 novos embriões somáticos globulares por calo. Além disso, a combinação de 0,5 μM de ANA e 10 μM de BAP proporcionou um número médio de 95 embriões somáticos globulares por calo. Na maturação dos embriões somáticos, o meio de cultura WPM contendo 0,5 μM de ANA e 20 μM de 2-iP proporcionou maior porcentagem de embriões maduros, comparado com 5 e 10 μM de 2-iP, porém esta foi baixa e assíncrona. No meio de maturação WPM sem regulador vegetal adicionado de 7% de PEG, houve formação de embriões somáticos em todos os estádios de desenvolvimento, mas na ausência de PEG, apenas novos embriões somáticos globulares foram observados. A substituição da sacarose pela maltose não aumentou o número de embriões somáticos maduros. Na conversão dos embriões somáticos, os ciclos repetitivos de divisão celular não foram interrompidos e a conversão dos embriões somáticos em plantas não foi constatada. No estudo morfoanatômico, foi possível observar os diferentes estádios ontogênicos dos embriões somáticos de *Ocotea porosa*. Desta forma, podemos concluir que a formação de embriões somáticos dessa espécie é viável e pode ser obtida a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos ou sementes inteiras imaturas, em meio de cultura WPM contendo 200 μM de 2,4-D e 0,5 g L^{-1} de caseína hidrolisada. Os ciclos repetitivos podem ser mantidos no mesmo meio de cultura contendo 0,5 μM de ANA e 10 μM de BAP ou 0,5 g L^{-1} de caseína hidrolisada sem regulador vegetal. Foi constatada baixa porcentagem e assincronia na maturação dos embriões somáticos e ausência de conversão dos embriões somáticos em plantas. Assim, há necessidade de experimentos futuros visando otimizar a maturação dos embriões somáticos e conversão em plantas para estabelecer um protocolo completo de embriogênese somática de *Ocotea porosa*.

Palavras-chave: 2,4-D, eixos embrionários zigóticos imaturos, caseína hidrolisada, maltose, picloram, polietileno glicol.

ABSTRACT

The main purpose of this study was to determine the best type of explant, type and appropriate concentrations of plant growth regulators and amino acids in the induction of somatic embryos of *Ocotea porosa*, to establish repetitive cycles of somatic embryogenesis and study the effect of different plant growth regulators and osmotic agents in the maturation and conversion of somatic embryos. It was observed that, in the explants excised from inflorescences, leaf disks, petioles, apical buds and mature zygotic embryonic axes, there was not induction of somatic embryos. The induction of somatic embryos and embryogenic mass occurred in immature zygotic embryonic axes and immature seeds. In WPM culture medium supplemented with 200 μM 2,4-D and 1.0 g L^{-1} glutamine or casein hydrolysate, 8.3% of the immature zygotic embryonic axes formed somatic embryos. In immature seeds grown under the same conditions, it ranged from 10 to 24%. The immature zygotic embryonic axes cultured in culture medium WPM containing 2,4-D presented higher percentage of somatic embryo induction compared with the addition of NAA or picloram. During maintenance of embryogenic cultures via repetitive embryogenesis the addition of 1 g L^{-1} casein hydrolysate in WPM culture medium induced on average 61.8 new globular somatic embryos per callus. Furthermore, the combination of 0.5 μM NAA and 10 μM BAP provided an average of 95 somatic embryos per globular callus. In the maturation of somatic embryos, the WPM culture medium containing 0.5 μM NAA and 20 μM 2-iP provided higher percentage of mature embryos, compared with 5 μM NAA and 10 μM 2-iP, but this was low and asynchronous. In medium of maturation WPM free growth regulator supplemented with 7% PEG, the formation of somatic embryos occurred at all stages of development, but in the absence of PEG, only new globular somatic embryos were observed. The substitution of sucrose by maltose did not increase the number of mature somatic embryos. In the conversion of somatic embryos, the repetitive cycles of cell division were not interrupted and the conversion of somatic embryos into plants was not detected. In the morfoanatomical study it was possible to observe the different ontogenic stages of *Ocotea porosa* somatic embryos. Thus, we conclude that the induction of somatic embryos of this species is feasible and can be obtained from immature zygotic embryonic axes or immature seeds in WPM culture medium containing 200 μM 2,4-D and 0.5 g L^{-1} casein hydrolysate. The repetitive cycles of somatic embryogenesis can be maintained in the WPM culture medium containing 0.5 μM NAA and 10 μM BAP or 0.5 g L^{-1} casein hydrolysate without growth regulators. The percentage of mature embryos was low and asynchronous and they were not converted into plants. Thus, further experiments are needed in order to optimize the maturation of somatic embryos and conversion in plants to establish a full protocol of somatic embryogenesis of *Ocotea porosa*.

Key words: 2,4-D, immature zygotic embryonic axes, casein hydrolysate, maltose, picloram, polyethylene glycol.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 A ESPÉCIE <i>Ocotea porosa</i>	16
2.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	17
2.2.1 Embriogênese somática em Lauraceae.....	19
2.3 ESTÁDIOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	20
2.3.1 Indução de culturas embriogênicas.....	20
2.3.2 Manutenção e multiplicação de culturas embriogênicas.....	23
2.3.3 Desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos.....	24
2.3.4 Conversão de embriões somáticos em plantas.....	26
2.4 MORFOANATOMIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 DESINFESTAÇÃO E INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS.....	29
3.1.1 Efeito do NaClO na desinfestação de inflorescências.....	29
3.1.2 Efeito do NaClO e HgCl ₂ na desinfestação de inflorescências.....	29
3.1.3 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D combinado com 2-iP na indução de embriões somáticos em inflorescências.....	30
3.1.4 Efeito do 2,4-D combinado com 2-iP e carvão ativado na indução de embriões somáticos a partir de inflorescências.....	30
3.2 INDUÇÃO DE CALOS EM DISCOS FOLIARES, PECÍOLOS E GEMAS APICAIS.....	31
3.2.1 Efeito de diferentes tipos de explantes na indução de culturas embriogênicas....	31
3.2.2 Efeito de diferentes auxinas na indução de culturas embriogênicas a partir de discos foliares.....	31
3.3 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EIXOS EMBRIONÁRIOS ZIGÓTICOS MADUROS.....	32
3.3.1 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de embriões somáticos	32
3.3.1.1 Manutenção de calos obtidas em meio MS e WPM.....	32
3.3.2 Efeito do 2,4-D combinado com caseína hidrolisada em meio de cultura MS ou WPM.....	33
3.3.3 Efeito de diferentes aminoácidos na indução de embriões somáticos.....	33
3.4 INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE EIXO EMBRIONÁRIO ZIGÓTICO IMATURO E DE SEMENTE IMATURA.....	34
3.4.1 Efeito do 2,4-D combinado com caseína hidrolisada ou glutamina na indução de embriões somáticos.....	35
3.4.2 Efeito do 2,4-D e da caseína hidrolisada na indução de embriões somáticos a partir de sementes imaturas.....	35
3.4.3 Efeito do 2,4-D e caseína hidrolisada na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos.....	35
3.4.4 Efeito do 2,4-D, ANA e picloram na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos.....	35
3.5 EMBRIOGENESE REPETITIVA.....	36
3.5.1 Efeito da caseína hidrolisada e da glutamina na indução de embriões somáticos secundários.....	36
3.5.2 Efeito de combinações de ANA e BAP na indução de embriões somáticos	

secundários.....	37
3.5.3 Morfoanatomia de embriões somáticos secundários.....	37
3.6 MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	37
3.6.1 Efeito da combinação de ANA e 2-iP na maturação de embriões somáticos.....	37
3.6.2 Efeito do PEG na maturação de embriões somáticos.....	37
3.6.3 Efeito do PEG combinado com maltose na maturação de embriões somáticos.....	38
3.7 CONVERSÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PLANTAS.....	38
3.8 AVALIAÇÕES.....	38
3.9 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	39
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 DESINFESTAÇÃO E INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS.....	40
4.1.1 Efeito do NaClO na desinfestação de inflorescências.....	40
4.1.2 Efeito do NaClO e HgCl ₂ na desinfestação de inflorescências.....	40
4.1.3 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D combinadas com 2-iP na indução de embriões somáticos em inflorescências.....	41
4.1.4 Efeito do 2,4-D combinado com 2-iP e carvão ativado na indução de embriões somáticos a partir de inflorescências.....	42
4.2 INDUÇÃO DE CALOS EM DISCOS FOLIARES, PECÍOLOS E GEMAS APICAIS.....	42
4.2.1 Efeito de diferentes tipos de explantes na indução de calos.....	42
4.2.2 Efeito de diferentes auxinas na indução de calos a partir de discos foliares.....	44
4.3 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EIXOS EMBRIONÁRIOS ZIGÓTICOS MADUROS.....	46
4.3.1 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de embriões somáticos..	46
4.3.1.1 Manutenção de calos obtidas em meio MS e WPM.....	48
4.3.2 Efeito do 2,4-D combinado com caseína hidrolisada em meio de cultura MS ou WPM.....	49
4.3.3 Efeito de diferentes aminoácidos na indução da embriogênese somática.....	50
4.4 INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE EIXOS EMBRIONÁRIOS ZIGÓTICOS IMATUROS E DE SEMENTES IMATURAS.....	52
4.4.1 Efeito do 2,4-D combinado com caseína hidrolisada ou glutamina na indução de embriões somáticos.....	52
4.4.2 Efeito do 2,4-D e da caseína hidrolisada na indução de embriões somáticos a partir de sementes imaturas.....	54
4.4.3 Efeito do 2,4-D e da caseína hidrolisada na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos.....	56
4.4.4 Efeito do 2,4-D, ANA e picloram na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos.....	57
4.5 EMBRIOGÊNESE REPETITIVA.....	59
4.5.1 Efeito da caseína hidrolisada e da glutamina na indução de embriões somáticos secundários.....	59
4.5.2 Efeito de combinações de ANA e BAP na indução de embriões somáticos secundários.....	61
4.5.3 Morfoanatomia de embriões somáticos secundários.....	62
4.6 MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	63
4.6.1 Efeito da combinação de ANA e 2-iP na maturação de embriões somáticos.....	63
4.6.2 Efeito do PEG na maturação de embriões somáticos.....	65

4.6.3 Efeito do PEG combinado com maltose na maturação de embriões somáticos.....	66
4.7 CONVERSÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PLANTAS.....	68
5 CONCLUSÕES.....	69
6 RECOMENDAÇÕES	70
7 REFERÊNCIAS DE LITERATURA.....	71
FIGURAS.....	84
ANEXOS.....	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Diferentes tipos de explantes tesados na embriogênese somática de *Ocotea porosa*. a) Inflorescências. b) Folhas jovens de planta matriz. Barra: 3,4 mm. c) Discos foliares, pecíolo, gema apical. d) Frutos imaturos Barra: 2 mm. e) Eixo embrionário zigótico. Barra: 4,2 mm. f) Eixo embrionário isolado em meio de cultura de indução. Barra: 3,9 mm 84
- Figura 2 a) Aspecto morfológico de calo escuro (marrom ou preto) cultivado em meio de cultura contendo 2,4-D (200 μM) após 60 dias (seta). Barra: 3,1 mm. b) Calo com massa friável (não embriogênica) obtido em meio de cultura contendo 200 μM de 2,4-D combinado com 0,5 g L^{-1} de caseína hidrolisada, após 90 dias (seta). Barra: 1,2 mm. c) Embrião somático em estágio globular e cordiforme (setas) obtido a partir de eixo embrionário zigótico imaturo cultivado em meio de cultura com 200 μM de 2,4-D + 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada, após 60 dias. Barra: 2,4 mm. d) Calo branco amarelado com setor friável em meio de cultura contendo 200 μM de 2,4-D combinado com 0,5 g L^{-1} de caseína hidrolisada, após 90 dias. Barra: 1,6 mm..... 85
- Figura 3 a) Embriões somáticos obtidos a partir de eixo embrionário zigótico imaturo em meio de cultura WPM acrescido de 200 μM de 2,4-D. Barra: 1,6 mm. b) Calo branco amarelado formado em meio de cultura WPM acrescido de 200 μM de ANA. Barra: 1,4 mm. c) Massa embriogênica contendo embriões somáticos (globular) formados em meio de cultura WPM com 400 μM de picloram. Barra: 2,4 mm. d) Embriões somáticos obtidos a partir de eixo embrionário zigótico imaturo em meio WPM, 400 μM de 2,4-D e 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada. Barra: 2,1 mm. e) Embriões globulares formados em meio WPM e de 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada. Barra: 1,1 mm. f) embriões globulares formados em meio de cultura WPM acrescido de 0,5 μM de ANA e 10 μM de BAP. Barra: 2,4 mm..... 86
- Figura 4 Estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *Ocotea porosa*. a) Secção longitudinal do pró-embrião (seta). Barra: 150 μm . b) Secção longitudinal com células isodiamétricas com núcleo grande, nucléolo proeminente e divisão anticlinal e periclinal (seta). Barra: 30 μm . c) Embrião somático globular. Barra: 100 μm . d) secção longitudinal do embrião cordiforme, com início da formação do pró-câmbio (seta). Barra: 65 μm . e) Detalhe da epiderme definida no embrião somático cordiforme. Barra: 50 μm . f) Detalhe do início da formação do procâmbio do embrião cordiforme (seta). Barra: 40 μm . g-h) Secção longitudinal do embrião somático cotiledonar, barra: 100 μm . i) Divisão anticlinal e periclinal e organização do meristema apical. Barra: 20 μm 87
- Figura 5 a-b) Embriões somáticos formados em meio WPM contendo 7% de PEG 6000. Barra: 1,3 e 3,4 mm. c) Embriões somáticos formados em meio WPM acrescido de 7% PEG 6000 e 6% de maltose. Barra: 2,0 mm. d) Embrião somático torpedo formado em meio de cultura de conversão contendo 0,58 μM de GA_3 e 1 μM de BAP. Barra: 4,0 mm. e) Embriões somáticos globulares formados em meio de cultura de conversão contendo 0,54 μM de ANA e 10 μM de putrescina. Barra: 1,8 mm..... 88
- Figura 6 Esquemática do protocolo de regeneração de *Ocotea porosa* a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos como fonte de explantes..... 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito do NaClO na desinfestação de inflorescências de <i>Ocotea porosa</i> , após 30 dias.....	40
Tabela 2	Efeito de diferentes agentes na desinfestação de inflorescências de <i>Ocotea porosa</i> , após 30 dias.....	41
Tabela 3	Efeito do tipo de explante e dos agentes geleificantes utilizados para induzir a formação de calo branco amarelado em <i>Ocotea porosa</i> , após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM, adicionado de ANA (21,5 µM) e BAP (4,44 µM).....	43
Tabela 4	Efeito do tipo de explante e dos agentes geleificantes utilizados para induzir a formação de calos escuros em <i>Ocotea porosa</i> , após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM, adicionado de ANA (21,5 µM) e BAP (4,44 µM).....	43
Tabela 5	Efeito do 2,4-D e ANA combinados com 4,44 µM de BAP e 0,2 g L ⁻¹ de caseína hidrolisada (CH) na indução de calos a partir de discos foliares basais de <i>Ocotea porosa</i> , após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM solidificado com ágar (3,5 g L ⁻¹).	45
Tabela 6	Efeito do 2,4-D e ANA combinados com 4,44 µM de BAP e 0,2 g L ⁻¹ de caseína hidrolisada (CH) na indução de calos a partir de discos foliares basais de <i>Ocotea porosa</i> , após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM solidificado com ágar (3,5 g L ⁻¹).....	45
Tabela 7	Indução de culturas embriogênicas a partir de eixos embrionários zigóticos maduros de <i>Ocotea porosa</i> cultivados em meio de cultura MS contendo sacarose (20 g L ⁻¹), carvão ativado (1,5 g L ⁻¹), ágar (4 g L ⁻¹) e diferentes concentrações de 2,4-D, após 90 dias de cultivo.....	46
Tabela 8	Indução de culturas embriogênicas a partir de eixos embrionários zigóticos maduros de <i>Ocotea porosa</i> cultivados em meio de cultura WPM contendo sacarose (20 g L ⁻¹), carvão ativado (1,5 g L ⁻¹), ágar (4 g L ⁻¹) e diferentes concentrações de 2,4-D, após 90 dias de cultivo.....	47
Tabela 9	Efeito da combinação de auxina (2,4-D) e caseína hidrolisada (CH) na indução de embriões somáticos de <i>Ocotea porosa</i> , a partir de eixos embrionários zigóticos maduros cultivados em meio de cultura MS, após 120 dias.....	49
Tabela 10	Efeito da combinação de auxina (2,4-D) e caseína hidrolisada (CH) na indução de embriões somáticos de <i>Ocotea porosa</i> , a partir de eixos embrionários zigóticos maduros cultivados em meio de cultura WPM, após 120 dias.....	50
Tabela 11	Efeito da caseína hidrolisada (CH), glutamina (GLN) e prolina (PRO) associadas com 200 µM de 2,4-D, na indução de embriões somáticos de <i>Ocotea porosa</i> a partir de eixos embrionários zigóticos maduros em meio de cultura WPM, 90 dias.....	51
Tabela 12	Efeito da caseína hidrolisada (CH) e da glutamina (GLN) na formação de massas celulares e de embriões somáticos em eixos embrionários zigóticos imaturos de <i>Ocotea porosa</i> cultivados em meio de cultura WPM suplementado com sacarose (20 g L ⁻¹), carvão ativado (1,5 g L ⁻¹), ágar (4 g L ⁻¹) e 2,4-D (200 µM), após 90 dias.....	53
Tabela 13	Efeito da combinação de auxina (2,4-D) e caseína hidrolisada (CH) na	

	indução de embriões somáticos de <i>Ocotea porosa</i> , a partir de sementes imaturas, após 60 dias.....	55
Tabela 14	Efeito da combinação de auxina (2,4-D) e caseína hidrolisada (CH) na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários imaturos de <i>Ocotea porosa</i> , após 90 dias de cultivo.....	56
Tabela 15	Efeito de diferentes auxinas na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários imaturos de <i>Ocotea porosa</i> , após 120 dias de cultivo.....	57
Tabela 16	Embriogênese somática repetitiva a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos de <i>Ocotea porosa</i> em meio de cultura WPM com CH e GLN, após 30 dias de cultivo.....	60
Tabela 17	Embriogênese somática repetitiva a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos de <i>Ocotea porosa</i> durante três subcultivos em meio de cultura WPM suplementado com 0,5 µM de ANA combinado com BAP.....	61
Tabela 18	Efeito do 2-iP combinado com ANA (0,5 µM) na maturação de embriões somáticos de <i>Ocotea porosa</i> após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM.....	63
Tabela 19	Efeito do PEG 6000 na maturação de embriões somáticos de <i>Ocotea porosa</i> após 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM.....	65
Tabela 20	Efeito da sacarose e maltose na maturação de embriões somáticos de <i>Ocotea porosa</i> após 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM com 7% de PEG 6000.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	- Ácido indol-3-acético
AIB	- Ácido indol-3-butírico
ANA	- Ácido α -naftalenoacético
BAP	- 6-benzilaminopurina
CIN	- Cinetina
CH	- Caseína Hidrolisada
GLN	- Glutamina
2-IP	- N ⁶ -(2-isopentenil)adenina
ZEA	- Zeatina
MS	- Murashige e Skoog (1962)
WPM	- Meio de Lloyd e McCown (1980)
PVP	- Polivinilpirolidona
PA	- Poliamina
PRO	- Prolina
GA ₃	- Ácido giberélico
PIC	- Picloram
NaClO	- Hipoclorito de sódio
HgCl ₂	- Cloreto de mercúrio
PEG	- Polietileno glicol

1 INTRODUÇÃO

A Floresta Ombrófila Mista teve significativa importância no histórico de ocupação da região sul, não somente pela extensão territorial que ocupava, mas principalmente pelo valor econômico que representou durante quase um século (KLEIN, 1985). No início do século XX a exploração madeireira, juntamente com os desmatamentos, queimadas, substituição da vegetação por pastagens, agricultura, reflorestamentos com espécies exóticas e a expansão das zonas urbanas no sul do Brasil, provocaram uma dramática redução da área das florestas originais na região (MEDEIROS *et al.*, 2005). Com isso, a imbuia sofreu uma grave erosão genética, requerendo atenção especial quanto a sua conservação genética (CARVALHO, 2003).

A fragmentação de biomas e ecossistemas ocasionou a transformação de uma grande extensão de habitat, em numerosas manchas isoladas, onde um grande número de espécies foi perdido ou está ameaçado de extinção (FAHRIG, 2003), como é o caso da imbuia (CARVALHO, 2003). Tal pressão levou as populações de imbuia a tamanhos tão reduzidos que causou a inclusão da espécie na Lista Vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*), bem como na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (VARTY; GUADAGNIN, 1998; IBAMA, 2008). A madeira da imbuia é empregada na construção civil, em vigas, forros, tábuas e tacos para assoalhos, em portas, janelas e molduras, bem como na carpintaria e marcenaria. A imbuia tem potencial para arborização urbana; além disso, essa espécie apresenta características importantes para a recuperação de áreas degradadas devido ocorrer naturalmente em áreas de solos com baixa fertilidade natural, com altos teores de alumínio bem como na reposição de mata ciliar em áreas não inundáveis (REITZ *et al.*, 1978; CARVALHO, 2003).

As sementes da imbuia apresentam dormência tegumentar (CARVALHO, 2003) e, assim como outras espécies do gênero *Ocotea*, são recalcitrantes com elevado teor de água no ponto de maturação fisiológica, dificultando o armazenamento (BILIA *et al.*, 1998; CARVALHO, 2003). Devido a curta longevidade, as sementes apresentam baixa porcentagem final e irregularidade de germinação (TONIN, 2005). Experimentos realizados com sementes de *Ocotea porosa*, em ambiente controlado demonstraram grande variação na porcentagem de germinação. Sementes não tratadas apresentaram 59% de germinação enquanto que, para aquelas tratadas com ácido sulfúrico, a germinação máxima foi de 14% (KALIL-FILHO *et al.*, 2004). A propagação vegetativa de *Ocotea porosa* via estaquia é

baixa com o enraizamento máximo de 4% (INOUE; PUTTON, 2007). A micropropagação de *Ocotea porosa* por meio da multiplicação de gemas axilares foi estabelecida por PELEGRINI *et al.* (2011) obtendo em média 5,3 brotações por explante após o 4º subcultivo em meio de cultura MS com 5 µM de BAP e a maior porcentagem de brotações enraizadas foi de 68,7% após 30 dias.

A embriogênese somática pode desempenhar um papel importante na propagação clonal. É um o processo pelo qual células somáticas, sob condições indutivas, geram células embriogênicas, que sofrem uma série de alterações morfológicas e bioquímicas, resultando na formação de embriões somáticos (KOMAMINE *et al.*, 2005). Devido à totipotência celular, a embriogênese somática tem sido um modelo para o estudo das características morfológicas, fisiológicas, moleculares e dos eventos bioquímicos que ocorrem durante o início e desenvolvimento da embriogênese em plantas superiores. Além disso, ela tem aplicações biotecnológicas, como produção de sementes artificiais, micropropagação e obtenção de plantas transgênicas (QUEIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006).

O objetivo geral deste trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação de *Ocotea porosa* por meio da embriogênese somática.

Para alcançar esse objetivo, foram definidos alguns objetivos específicos:

- a) Determinar o melhor tipo de explante para indução e iniciação de culturas embriogênicas.
- b) Testar diferentes tipos e combinações de reguladores vegetais na indução e iniciação de culturas embriogênicas e na indução e manutenção da embriogênese repetitiva.
- c) Testar o efeito da glutamina e caseína hidrolisada na indução e desenvolvimento dos embriões somáticos.
- d) Testar diferentes agentes osmóticos como PEG e maltose bem como o efeito de diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais na maturação e conversão de embriões somáticos.
- e) Caracterizar as alterações morfo-anatômicas do desenvolvimento dos embriões somáticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A ESPÉCIE *Ocotea porosa*

Ocotea porosa pertence à família Lauraceae e é conhecida como imbuia, embuia, canela-imbuia, canela-preta, canela-broto. *Oreodaphne porosa* e *Phoebe porosa* são as sinônimas botânicas para esta espécie (CARVALHO, 2003). Encontrada na Floresta Ombrófila Mista (FOM), também chamada popularmente de Mata de Araucárias, por apresentar como constituinte principal a *Araucaria angustifolia* (GUERRA *et al.*, 2002). A imbuia é encontrada desde o Sul do Brasil até o Sudeste (REITZ *et al.*, 1978), região esta de ocorrência da Floresta Ombrófila Mista (CARVALHO, 2003; CASTELLA; BRITZ, 2004). Segundo Wanderley *et al.* (2003), esta espécie também ocorre no Paraguai.

A imbuia apresenta flores pequenas agrupadas em inflorescências e, com a floração ocorrendo no período de outubro a dezembro e a frutificação de fevereiro a abril (CARVALHO, 2003), apresentando um padrão sazonal anual de produção de frutos (REGÔ *et al.*, 2006). O fruto é drupáceo, de superfície lisa lustrosa, de cor roxo-escuro, unilocular (HERTEL, 1974). A semente apresenta superfície lisa, contendo numerosas estrias, medindo 12 a 20 mm de diâmetro e geralmente divide-se em duas metades semi-globulosas. O número de sementes por quilograma varia entre 400 e 780 unidades (CARVALHO, 2003).

O crescimento da *Ocotea porosa* é considerado bastante lento (SILVA, 1997). No entanto, uma árvore adulta, pode atingir até 30 m de altura e 320 cm ou mais de DAP. O tronco é tortuoso, irregular, com fuste comumente curto (CARVALHO, 2003). A madeira é moderadamente pesada, resistente a fungos (WANDERLEY *et al.*, 2003), com boa durabilidade natural e maleabilidade (CARVALHO, 2003). Possui cerne pouco diferenciado do alburno e superfície irregular lustrosa e lisa, geralmente apresentando estrias paralelas e veios que variam nas cores pretas, castanhas ou avermelhadas, ora aparecem paralelos ora ondulados, às vezes formando figuras atraentes, com isso a madeira da imbuia apresenta alta qualidade sendo empregada desde a marcenaria até a construção civil (CARVALHO, 2003).

2.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática constitui um exemplo da expressão da totipotencialidade, postulada por Haberlandt em 1902, em que as células vegetais possuem a capacidade de regenerar indivíduos completos a partir de uma única célula (IKEDA; UMEHARA, 2006). A embriogênese somática inicia-se com a indução de células com capacidade embriogênica, seguida pela formação do embrião somático, maturação, conversão e regeneração da plântula (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

A indução e o controle da embriogênese somática *in vitro* são dependentes da fonte de explante, do genótipo da planta mãe e do tipo e nível de regulador vegetal adicionado no meio de cultura, como o 2,4-D, uma fonte de auxina normalmente empregada para aquisição da competência embriogênica (GUERRA *et al.*, 1999). Outros fatores externos tais como composição do meio de cultura, luz, temperatura e presença de indutores de estresse, afetam o desenvolvimento *in vitro* de células e tecidos. A melhor compreensão dos fatores que controlam a indução de embriões somáticos ajuda a melhorar a eficiência dos protocolos (PINTO *et al.*, 2008). Para aquisição da competência, ocorrem alterações bioquímicas e morfológicas bem como a reprogramação dos padrões de expressão gênica (ROJAS-HERRERA *et al.*, 2002; FEHÉR *et al.*, 2003), sendo este o principal ponto de controle da ontogenia (ROJAS-HERRERA *et al.*, 2002). A reprogramação da expressão gênica é governada por genes reguladores, incluindo os de codificação de fatores de transcrição (FEHÉR *et al.*, 2003).

Para expressão da competência embriogênica, deve haver um balanço dos reguladores vegetais fornecidos no meio de cultura e os hormônios endógenos do explante primário (JIMENEZ, 2005). Os processos moleculares que regulam a propriedade de competência embriogênica em células vegetais ainda são desconhecidas (MORDHORST *et al.*, 1997). A transição entre o estágio de células somáticas para embriogênica é um processo complexo que inclui desdiferenciação, a reativação celular, divisão, bem como metabólica, e reprogramação do desenvolvimento (FEHÉR *et al.*, 2003). Um dos genes, primeiramente descrito como expressão de células competentes em cultura de tecidos de cenoura (*Daucus carota*) é o gene *DcSERK* (“somatic embryogenesis receptor kinase”) (SCHMIDT *et al.*, 1997), que codifica uma repetição “Leurich (LRR) transmembrane-receptor kinase” (RLK), e pertence a uma grande e diversificada família de receptores de quinases em plantas (BECRAFT, 1998). Células individuais competentes de cenoura destinadas a se desenvolver em embriões somáticos expressaram o gene repórter da luciferase sob o controle de

elementos reguladores DcSERK, demonstrando que este gene é um marcador para células individuais competentes (SCHMIDT *et al.*, 1997).

Embriogênese somática é também um sistema ideal para investigar o processo de diferenciação em plantas, bem como totipotência celular e competência, que é o potencial para a reprogramação de uma célula como uma resposta a sinais específicos (HANAI *et al.*, 2010). Desta forma, com o objetivo de detalhar o desenvolvimento *in vitro* de *Ocotea catharinensis*, Santa-Catarina *et al.* (2004b) examinaram os níveis de poliaminas e aminoácidos relacionados à síntese de putrescina, a degradação de poliaminas e, a síntese de S-adenosilmetionina, juntamente com uma comparação da expressão do gene SERK e a competência embrionária de agregados celulares cultivados em diferentes meios. A caracterização completa deste sistema, no entanto, exige a identificação de marcadores adicionais, tais como alterações na metilação do DNA durante a diferenciação celular e embriogênese.

Durante a fase morfogênética, o desenvolvimento do embrião zigótico é dividido em quatro fases seqüenciais de mudanças morfogênicas: globular, cordiforme, torpedo e estágio cotiledonar (eudicotiledôneas); globular, escutelar e coleoptilar (monocotiledôneas) e globular, cotiledonar precoce e cotiledonar tardia (coníferas) (QUEIROZ-FIGUEROA, 2006).

Além da regeneração de plantas em larga escala, a embriogênese somática apresenta outras aplicações tais como: a transformação genética de plantas e a produção de sementes sintéticas (VON ARNOLD *et al.*, 2002). Outra aplicação dos embriões somáticos ou de culturas embriogênicas é a criopreservação que, por sua vez, torna possível estabelecer bancos de germoplasma (VON ARNOLD *et al.*, 2002; KONIECZNY *et al.*, 2010). Além disso, Konieczny *et al.* (2010) relataram que a embriogênese somática é geralmente preferida sobre outros métodos de regeneração de plantas *in vitro*, uma vez que permite que a propagação seja incrementada com o uso de biorreatores. Assim, esta técnica pode ser considerada uma ferramenta eficiente e importante na propagação clonal (STASOLLA; YUENG, 2003) e amplamente empregada em estudos biotecnológicos (IKEDA; UMEHARA, 2006).

2.2.1 Embriogênese somática em Lauraceae

A embriogênese somática tem sido induzida em centenas de espécies (angiospermas e gimnospermas), incluindo um grande número de espécies lenhosas (THORPE; STOLLA, 2001) e palmeiras (LEDO *et al.*, 2002; EKE *et al.*, 2005; SANÉ *et al.*, 2006; STEINMACHER *et al.*, 2007a,b). A embriogênese somática já foi estudada em várias espécies florestais da família Lauraceae, como *Laurus nobilis* (CANHOTO *et al.*, 1999), *Persea americana* Mill (PLIEGO-ALFARO, 1988; WITJAKSONO *et al.*, 1999; SANCHEZ-ROMERO, 2006), *Ocotea catharinensis* (VIANA; MANTELL, 1999; SANTA-CATARINA *et al.*, 2003) e *Ocotea odorifera* (SANTA-CATARINA *et al.*, 2001).

Diferentes formulações salinas foram utilizadas na embriogênese somática de Lauraceae. O meio de cultura MS e MS $\frac{1}{2}$ (MS com a concentração de sais reduzida pela metade) apresentaram bons resultados para *Ocotea catharinensis* (MOURA-COSTA *et al.*, 1993; MOSER *et al.*, 2004; SANTA-CATARINA *et al.*, 2005), *Persea americana* (PLIEGO-ALFARO; MURASHIGE, 1988; SUAREZ *et al.*, 2006), *Ocotea odorifera* (SANTA-CATARINA *et al.*, 2001) e *Sassafras randaiense* (WANG *et al.*, 1991). Outras formulações como as dos meios de cultura WPM e WPM $\frac{1}{2}$ (WPM com sais reduzidos pela metade), B5 (GAMBORG *et al.*, 1968) e B5 $\frac{1}{2}$ (B5 com sais reduzidos pela metade) também foram utilizadas para *Ocotea catharinensis* (VIANA, 1998; MOURA-COSTA *et al.*, 1993; SANTA-CATARINA *et al.*, 2003; 2004a; 2005).

Em geral, a indução da embriogênese somática em espécies do gênero *Ocotea*, ocorreu em meio de cultura acrescido de 2,4-D. Em *Ocotea catharinensis* a presença de 2,4-D no meio de cultura foi fundamental para expressão do gene SERK, evidenciando a aquisição da competência celular (SANTA-CATARINA *et al.*, 2004b). O 2,4-D (2,2 μ M) também apresentou maior eficiência na cultura em suspensão de embriões de *Ocotea catharinensis* (MOSER *et al.*, 2004). Outro composto como o sorbitol parece ter sido efetivo na aquisição da competência embriogênica em agregados celulares de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura WPM (SANTA-CATARINA *et al.*, 2004b). A indução da embriogênese somática em *Ocotea catharinensis* a partir de eixo embrionário maduro ocorreu em meio de cultura MS, suplementado com 20 g L $^{-1}$ de sacarose, 3 g L $^{-1}$ de carvão ativado e 8 g L $^{-1}$ de ágar (MOURA-COSTA *et al.*, 1993). Em *Ocotea odorifera*, culturas embriogênicas foram induzidas a partir de eixos embrionários, em meio de cultura MS contendo 72 e 144 μ M de 2,4-D (SANTA-CATARINA *et al.*, 2001).

A multiplicação de agregados celulares de *Ocotea catharinensis* foi realizada em meio de cultura MS contendo 3 g L⁻¹ de carvão ativado e 362 µM de 2,4-D e o desenvolvimento de estruturas globulares foram obtidos em meio de cultura WPM com 3 g L⁻¹ de carvão ativado e 181 µM de 2,4-D (MOURA-COSTA *et al.*, 1993). Segundo SANTA-CATARINA *et al.* (2004a), o meio de cultura WPM suplementado com 400 mg L⁻¹ de glutamina, 22,7 g L⁻¹ de sorbitol, 2 g L⁻¹ de Phytigel® e 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado foi eficiente para embriogênese repetitiva de *Ocotea catharinensis*.

A maturação de embriões somáticos de *Ocotea catharinensis* foi obtida em meio WPM suplementado com 22,7 g L⁻¹ de sorbitol, 2 g L⁻¹ de Phytigel®, 20 g L⁻¹ de sacarose e 400 mg L⁻¹ de glutamina (SANTA-CATARINA *et al.*, 2005) e a conversão dos embriões somáticos em plantas foi realizada em meio de cultura B5½ suplementado de 115,6 µM de GA₃ e 214,8 µM de ANA (SANTA-CATARINA *et al.*, 2005). Moura-Costa *et al.* (1993) relataram que a conversão de embriões somáticos de *Ocotea catharinensis*, ocorreu em meio de cultura WPM½, contendo 90,5 µM de 2,4-D por um mês e após a formação de raízes, essas estruturas foram transferidas para o mesmo meio com 0,905 µM de 2,4-D e 1,4 µM de GA₃. WANG *et al.* (1991) obtiveram a conversão dos embriões somáticos em plantas de *Sassafras randaiense* em meio de cultura MS½ líquido ou sólido suplementado ou não de 7,23 µM e 28,89 µM de GA₃ e a maior taxa de conversão dos embriões (32%) ocorreu na ausência de GA₃.

2.3 ESTÁDIOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

2.3.1 Indução de culturas embriogênicas

A indução da embriogênese somática tem sido relatada a partir de diversos tipos de tecidos vegetais tais como: inflorescências (GUERRA *et al.*, 2000; TEIXEIRA; MARBACH, 2003), embriões zigóticos, bainhas foliares (STEINMACHER *et al.*, 2007a), embriões zigóticos imaturos (RIBAS *et al.*, 2000; SANTA-CATARINA *et al.*, 2001; DAL VESCO; GUERRA, 2001), embriões zigóticos maduros (LAMB *et al.*, 2002; SANTA-CATARINA *et al.*, 2005), ovários não fertilizados (PERERA *et al.*, 2007), cotilédones

(CANGAHUALA-INOCENTE, 2002) e hipocótilos (SUN *et al.*, 2003). O estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos utilizados para a indução das culturas embriogênicas é fundamental para a expressão do seu potencial morfogênético (LITZ *et al.*, 1998; CHALUPA, 1999). Outros tecidos como ápices caulinares (CHEE; CANTLIFFE, 1992), folhas (RUFFONI *et al.*, 1990), pecíolos (CASTILLO; SMITH, 1997) e raízes (WU *et al.*, 2004; IANTCHEVA *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2005) também foram utilizados na indução da embriogênese somática.

Para algumas espécies da família Lauraceae como *Ocotea catharinensis* (MOURA-COSTA *et al.*, 1993; SANTA-CATARINA *et al.*, 2005; 2006) e *Sassafras randaiense* (WANG *et al.*, 1991), a embriogênese somática foi induzida a partir de embriões zigóticos maduros, enquanto que embriões zigóticos imaturos e tecido nucelar foram utilizados no caso de *Ocotea odorifera* (SANTA-CATARINA *et al.*, 2001) e *Persea americana* (PLIEGO-ALFARO; MURASHIGE, 1988; SUAREZ *et al.*, 2006).

Dentre as auxinas sintéticas utilizadas na embriogênese somática, o 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) é relatado como o mais eficiente e, portanto, é o mais utilizado na maioria das culturas embriogênicas (FEHÉR *et al.*, 2001, 2002). O 2,4-D atua indiretamente por meio de um aumento nos níveis endógenos do AIA (ácido indol acético) alterando o metabolismo das auxinas (FEHÉR *et al.*, 2001, 2002). Fehér *et al.* (2003) propuseram que o 2,4-D, quando acrescido acima de uma determinada concentração, possui duplo efeito nas culturas: como uma auxina ou como um agente de estresse. Além do 2,4-D (49%), outras auxinas são empregadas na embriogênese somáticas, porém com menor frequência, como: ácido naftaleno acético (ANA) (27%), ácido indol acético (AIA) (6%), ácido indol butírico (AIB) (6%), picloram (5%) e dicamba (5%) (FEHÉR *et al.*, 2003).

As citocininas também são importantes na indução da embriogênese somática e podem ser utilizadas na presença ou ausência de auxina (MERKLE *et al.*, 1995). Atuam na divisão celular, sendo necessárias na regulação da síntese de proteínas que estão envolvidas diretamente no ciclo celular (VAN STADEN *et al.*, 2008). Entre as citocininas, a 6-benzilaminopurina (BAP) é utilizada com maior frequência (57%), seguida pela cinetina (CIN) (37%), zeatina (ZEA) (3%) e pelo tidiazuron (TDZ) (3%).

A indução da embriogênese somática ocorre em explantes cujas células são determinadas ou pré-embriogênicas (FEHÉR *et al.*, 2003). A primeira fase se inicia com a desdiferenciação das células, as quais tornam-se competentes e determinadas para a embriogênese. Estes processos envolvem mecanismos complexos de reativação celular, divisão e reprogramação do metabolismo e desenvolvimento (FEHÉR *et al.*, 2003). O termo

células embriogênicas freqüentemente é utilizado para aquelas células que tenham completado a sua transição do estágio somático para o estágio embriogênico. Neste caso, a aplicação de reguladores vegetais não é necessária para a produção de embriões somáticos (GUERRA *et al.*, 1999).

Duas rotas são possíveis para obtenção de embriões somáticos, a direta e a indireta. A embriogênese somática direta deve ocorrer a partir de células pré-determinadas. Em contraste, a embriogênese indireta ocorre a partir de células não determinadas e não diferenciadas formando primeiro o calo, podendo ser embriogênico ou não (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

Na embriogênese, o transporte e distribuição de auxinas afetam principalmente a formação do eixo embrionário (UMEHARA *et al.*, 2007). Com exceção da auxina como indutor (FEHÉR *et al.*, 2002) a embriogênese somática tem sido relatada em resposta à presença de outros reguladores vegetais, tais como citocininas (SAGARE *et al.*, 2000) ou ácido abscísico (NISHIWAKI *et al.*, 2000) bem como a ausência de reguladores vegetais (CHOI *et al.*, 1998; SHI *et al.*, 2009). A adição de reguladores vegetais ao meio de cultura é a forma preferida para induzir respostas embriogênicas *in vitro*, na maioria dos vegetais (JIMENEZ, 2005), enquanto que a embriogênese somática foi induzida em meio de cultura livre de regulador em apenas 7% dos protocolos pesquisados (GAJ, 2004).

Indutores não hormonais, incluindo altas concentrações de sacarose e agentes osmóticos, metais pesados e alta temperatura, também podem ser utilizados para promover a transição do estágio somático para o embriogênico (FEHÉR *et al.*, 2003). Neste sentido, a adição de sorbitol ao meio de cultura WPM foi efetiva na aquisição da competência embriogênica de agregados celulares de *Ocotea catharinensis* (SANTA-CATARINA *et al.*, 2004b). A adição de prolina (2,5 mM) no meio de cultura foi fundamental para indução de embriogênese somática de *Medicago arborea* (HITA *et al.*, 2003). FEHÉR *et al.* (2003) relataram que a ativação simultânea das respostas ao estresse e aos sinais auxina/ABA pode ser um evento chave na adaptação celular, causando reprogramações genéticas, metabólicas e fisiológicas, que resultam na competência embriogênica das células somáticas.

Os meios de cultura de MS e MS^{1/2} (MS com a concentração de sais reduzida pela metade) foram utilizados em algumas espécies da família Lauraceae como *Ocotea catharinensis* (MOURA-COSTA *et al.*, 1993; MOSER *et al.*, 2004; SANTA-CATARINA *et al.*, 2005), *Persea americana* (PLIEGO-ALFARO; MURASHIGE, 1988; SUAREZ *et al.*, 2006), *Ocotea odorifera* (SANTA-CATARINA *et al.*, 2001) e *Sassafras randaiense* (WANG *et al.*, 1991). Outras formulações como as dos meios de cultura WPM e WPM^{1/2}

(WPM com sais reduzidos pela metade), B5 (GAMBORG *et al.*, 1968) e B5½ (B5 com sais reduzidos pela metade) também foram utilizadas para *Ocotea catharinensis* (MOURA-COSTA *et al.*, 1993; VIANA, 1998; SANTA-CATARINA *et al.*, 2003; 2004b; 2005).

O nitrogênio (N), assimilado na forma de glutamato e glutamina, é prontamente assimilado no metabolismo das plantas. Esses aminoácidos atuam como doadores de nitrogênio para biossíntese de outros aminoácidos, ácidos nucleicos e outros compostos nitrogenados. Alternativamente, eles podem ser incorporados aos aminoácidos aspartato e asparagina (LEA *et al.*, 2006). Caseína hidrolisada pode ser uma fonte de cálcio, fosfatos, diversos microelementos, vitaminas e, mais importante, uma mistura de até 18 aminoácidos, principalmente glutamina. Em consequência, a caseína hidrolisada é uma excelente fonte de nitrogênio reduzido (GEORGE e DE KLERK, 2008).

O carvão ativado é freqüentemente adicionado no meio de cultura para diminuir ou eliminar compostos indesejáveis e, assim, melhorar as respostas morfogênicas dos explantes (SÁENZ *et al.*, 2010). O carvão ativado adsorve compostos fenólicos e pode inativar polifenol oxidase e peroxidase (PAN; VAN STADEN, 1998). O carvão influencia o ambiente das plantas cultivadas *in vitro* por alterar as características físico-químicas do meio. Essas alterações incluem o escurecimento do meio de cultura, adsorção de substâncias inibidoras ou tóxicas e adsorção dos reguladores vegetais (PAN; VAN STADEN, 1998). O impacto mais importante da adição de carvão ativado no meio de cultura é uma redução drástica na concentração de reguladores vegetais e outros suplementos orgânicos. Isto ocorre devido à adsorção dessas substâncias pelo carvão ativado (THOMAS, 2008).

2.3.2 Manutenção e multiplicação de culturas embriogênicas

Para manutenção e multiplicação de culturas embriogênicas, é necessário determinar as condições adequadas para o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e o controle dos processos de diferenciação, de tal maneira que as culturas sejam constituídas por células pró-embriônicas ou embriões somáticos em estágio globular inicial de desenvolvimento (GUERRA *et al.*, 1999). Segundo Parrot *et al.* (1991) e Thorpe (1995), os ciclos repetitivos são inibidos pela remoção ou redução dos níveis de auxina no meio de cultura, permitindo que os embriões somáticos passem por todos os estágios de desenvolvimento até formarem uma planta completa.

Nessa etapa da embriogênese somática é possível a indução da embriogênese repetitiva, a qual permite a produção de massas embriogênicas ou embriões somáticos em larga escala (BAKER; WETZSTEIN, 1995). Porém, é importante evitar a formação de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (GREY; PUROHIT, 1991).

O início de novas culturas de embriões somáticos pode ser limitado por alguns fatores tais como: baixa produção de sementes (reduzindo a fonte de explantes), contaminação das culturas e baixa frequência de indução de embriões somáticos primários. Desta forma, a embriogênese somática repetitiva pode apresentar vantagens em relação à indução primária de embriões (SANTA CATARINA *et al.*, 2004a).

2.3.3 Desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos

A maturação é considerada uma etapa fundamental do desenvolvimento do embrião para a subsequente conversão e desenvolvimento da plântula (PERÁN-QUESADA *et al.*, 2004). Esta fase consiste em estabelecer condições que estimulem a progressão das fases iniciais de desenvolvimento dos embriões somáticos para as fases tardias. Os ciclos repetitivos de divisão celular são interrompidos e estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais são fornecidos para a diferenciação celular. Essa diferenciação celular deve ocorrer de tal maneira que os ciclos de desenvolvimento e maturação originam um grande número de embriões somáticos maduros, de alta qualidade e aptos a germinar (GUERRA *et al.*, 1999).

Segundo Pullman e Buchanan (2003), dentre os fatores limitantes da maturação e conversão dos embriões, podemos citar o limitado conhecimento das mudanças bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento e maturação do embrião zigótico. Assim, a determinação dos padrões bioquímicos durante o desenvolvimento embrionário pode fornecer subsídios para a otimização dos sistemas de propagação *in vitro* baseados na embriogênese somática. Durante a maturação dos embriões somáticos, a expansão celular e o acúmulo de substâncias de armazenamento são cruciais para estimular o processo de conversão. O incremento na massa do embrião é um indicador da qualidade do embrião e um pré-requisito para a conversão (GARCIA-MARTIN *et al.*, 2005).

Outro regulador vegetal empregado na embriogênese somática é o ácido abscísico (ABA). A adição deste no meio de cultura durante as fases finais do desenvolvimento dos

embriões somáticos, de certo modo, o aumento natural de hormônios endógenos observados em vários embriões zigóticos, é necessário para estimular maturação e, ao mesmo tempo, evitar germinação precoce, especialmente, mas não só nas coníferas (MAURI e MANZANERA, 2004; SHARMA *et al.* 2004; GARCÍA-MARTÍN *et al.*, 2005). O efeito positivo da ABA na inibição da precoce germinação e estimulação da maturação se estende até a conversão de embriões somáticos em plantas normais (JIMÉNEZ, 2005). Estudos têm mostrado efeitos benéficos do ABA no desenvolvimento de embriões somáticos, como no caso de embriões somáticos de cana-de-açúcar (NIEVES *et al.*, 2001) e gerânio (MADAKADZE; SENARATNA, 2000), onde a aplicação exógena de ABA aumentou o teor de proteínas de reserva.

Nessa etapa, os embriões somáticos devem estar maduros e fisiologicamente desenvolvidos para que ocorra a conversão. Os embriões devem apresentar morfologia externa normal e características internas semelhantes às dos embriões zigóticos. Essas características incluem os compostos de armazenamento como: proteínas, lipídeos e carboidratos (GUPTA *et al.*, 1991). O desenvolvimento polarizado do embrião inclui a formação de meristema caulinar e meristema da raiz, que mantém a polaridade apical-basal (JÜRGENS, 2001). Esses meristemas são grupos de células indiferenciadas formando novas células e tecidos, diferenciando-se em órgãos (FEHÉR *et al.*, 2003).

Vários fatores do meio de cultura e ambientais como nitrogênio reduzido, outros nutrientes inorgânicos, carboidratos, reguladores vegetais, luz e método de cultura, fazem parte das exigências para assegurar a maturação dos embriões somáticos (AMMIRATO, 1985; MERKLE *et al.*, 1995). O nitrogênio reduzido na forma de aminoácidos (glutamina, asparagina e arginina) é rapidamente assimilado e incorporado aos esqueletos carbônicos durante o metabolismo e a síntese de proteínas, quando comparado a outras fontes inorgânicas de nitrogênio (LEA, 1993). Outros compostos como os agentes osmóticos polietileno glicol (PEG), mio-inositol, sorbitol e manitol podem ser úteis ao desenvolvimento dos embriões. O aumento da osmolaridade causado por estes compostos parece estar relacionado com a transição do ciclo de divisão/diferenciação. Este aumento pode ser obtido pela concentração total do meio de cultura que deve variar entre 200 e 350 mM (GUERRA *et al.*, 1999). Dessa maneira, evita-se a germinação precoce e o desenvolvimento de embriões anormais, aumentando a taxa de conversão dos embriões em plantas (GUERRA *et al.*, 1999; CANGAHUALA-INOCENTE, 2002).

O estresse osmótico *in vitro* induzido com PEG de peso molecular acima de 4000 é o que mais se aproxima do estresse hídrico observado em células de embriões e plantas

sujeitas a condições de desidratação (VON ARNOLD *et al.*, 2002). A razão para isso é que as grandes moléculas de PEG não são capazes de atravessar a parede celular, enquanto a água é retirada, levando a uma reduzida pressão de turgor e um potencial osmótico intracelular mais negativo (VON ARNOLD *et al.*, 2002). O ABA, a exemplo de seus efeitos na embriogênese zigótica, também exerce efeito na maturação dos embriões somáticos, sendo geralmente usado para reduzir o processo de embriogênese repetitiva (GUERRA *et al.*, 1999) ou para inibir a germinação precoce (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

2.3.4 Conversão de embriões somáticos em plantas

A conversão de embriões somáticos em plantas é determinada pela germinação dos embriões somáticos em meio de cultura até que as folhas verdadeiras sejam formadas (SCHULTHEIS *et al.*, 1990). Tais meios de cultura são constituídos pela metade da concentração dos sais, sacarose (1 a 2%), carvão ativado, mio-inositol, vitaminas e baixo nível de nitrogênio reduzido na forma de aminoácidos.

Na maioria dos genótipos, o desenvolvimento e a conversão dos embriões somáticos em plantas são favorecidos em meios de cultura desprovidos de reguladores vegetais (MAY; TRIGIANO, 1991; CASTILLO; SMITH, 1997) ou com baixas concentrações de auxinas (MANDAL *et al.*, 1995) e/ou citocininas (VAN DER VALK *et al.*, 1992; LAMB *et al.*, 2002) ou ainda suplementados com ácido giberélico (GA₃) (CANGAHUALA-INOCENTE, 2002).

2.4 MORFOANATOMIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS

A embriogênese somática pode ser descrita como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de uma sequência ordenada de estádios embriogênicos característicos sem ocorrência de fusão dos gametas (GUERRA *et al.*, 1999; JIMÉNEZ, 2001). Apesar das semelhanças descritas entre a embriogênese zigótica e somática, existem duas diferenças marcantes, a falta de formação do endosperma e do suspensor no caso do sistema somático (DODEMAN *et al.*, 1997). Durante o seu desenvolvimento, os embriões somáticos passam por estádios similares

àqueles observados na embriogênese zigótica, caracterizando-se como estrutura bipolar sem nenhuma conexão vascular com o tecido materno (DURZAN, 1988; VICIENT e MARTINEZ, 1998), passando pelo estágio globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (eudicotiledôneas) (QUEIROZ-FIGUEROA, 2006).

Na embriogênese somática, as análises histológicas e morfológicas podem ser fundamentais para a interpretação dos resultados. Estas são utilizadas para identificar e caracterizar a formação de estruturas monopolares ou bipolares bem como caracterizar alterações celulares analisando a qualidade e o desenvolvimento dessas estruturas. As análises morfológicas permitem caracterizar a via de regeneração e compreender melhor a morfogênese *in vitro*, visando à otimização dos protocolos de obtenção de plântulas em cultura de tecidos (SILVA, 2005).

Estudos histológicos de embriões somáticos têm mostrado uma relação positiva entre alterações morfológicas e a baixa conversão de embriões somáticos em plantas (NICKLE; YUENG, 1994). Em geral, o processo de embriogênese somática pode ser iniciado a partir de uma única célula embriogênica ou um grupo destas, mas nem todas têm a capacidade de se converterem em pró-embriões. Consequentemente, o número de embriões somáticos formados é relativamente menor quando comparado ao número de pró-embriões globulares ou células embriogênicas. Essa baixa capacidade de conversão do embrião somático em planta não se restringe apenas às condições inadequadas do meio de cultura, mas também à ontogênese anormal ou imatura do embrião somático (MICHAUX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992). Desta forma, no processo da embriogênese somática, a análise histológica é uma ferramenta útil, uma vez que o estudo do desenvolvimento de células ou grupos de células pode ajudar a melhorar a eficiência dos protocolos (PEREZ-NUNEZ *et al.*, 2006). Observações histológicas, incluindo a análise ultra-estrutural de embriogênese somática, foram relatadas em algumas espécies (RIBAS *et al.*, 2000; VERDEIL *et al.*, 2001; SANÉ *et al.*, 2006).

O embrião somático pode apresentar desenvolvimento anormal. Alguns embriões somáticos produzem meristemas sem função, impedindo o seu desenvolvimento futuro. Em muitos embriões somáticos, os meristemas apicais se encontram parcialmente organizados ou não existem. Também podem apresentar algumas anomalias no seu padrão vascular. Alterações na formação dos seus meristemas podem levar a perda da capacidade de germinação (DODEMAN *et al.*, 1997).

A regeneração *in vitro* consiste basicamente em três estádios: a desdiferenciação onde o tecido adquire competência embriogênica para responder ao processo morfogênico; a

indução, quando as células se tornam determinadas a desenvolver estrutura bipolar (embriões somáticos) ou monopolar (ápice radicular ou caulinar) e o desenvolvimento com o crescimento dos órgãos ou do embrião (De KLERK *et al.*, 1997).

Na fase de indução, as análises histológicas permitem caracterizar as alterações celulares. As células embriogênicas caracterizam-se por ser pequenas com citoplasma denso, nucléolo grande, pouco vacuolizadas e com pequenos grânulos de amido (MICHAUX-FERRIÈRE e SCHWENDIMAN, 1992). O desenvolvimento dessas células não é sincronizado, variando conforme as condições do meio de cultura, sendo capazes de se dividir ou se envolverem na formação de embriões. As células que não formam pró-embriões começam o processo de diferenciação, ou seja, as vacuolizações, diminuição em volume do nucléolo e o acúmulo ou o desaparecimento dos grânulos de amido (MICHAUX-FERRIÈRE e SCHWENDIMAN, 1992).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba – Paraná (PR).

3.1 DESINFESTAÇÃO E INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS

As inflorescências foram coletadas em agosto e setembro de 2009, no Sítio São Marcos localizado no município de Campina Grande do Sul, e outubro de 2010 no Museu Nacional de História Natural Capão da Imbuia (Capão da Imbuia, Curitiba-PR) (Figura 1a). Os ramos com as inflorescências foram coletados com auxílio de podão e armazenados em frascos com a base imersa em água para evitar a desidratação das inflorescências.

3.1.1 Efeito do NaClO na desinfestação de inflorescências

As inflorescências coletadas em Campina Grande do Sul foram submetidas à desinfestação com etanol 70% (1 min), seguido de solução de NaClO (1, 2 e 3%) acrescido de 0,1% de Tween 20[®], (10 min) e, em seguida, lavadas seis vezes em água destilada esterilizada. As inflorescências foram inoculadas em meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), acrescido de sacarose (20 g L⁻¹), 2,4-D (20 µM), BAP (7,5 µM) e solidificado com ágar Vetec[®] (3,5 g L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo constituído de três tratamentos e seis repetições com dez inflorescências por parcela.

3.1.2 Efeito do NaClO e HgCl₂ na desinfestação de inflorescências

As inflorescências coletadas em Campina Grande do Sul foram submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação: a) HgCl₂ 0,05% (10 min), b) etanol 70% (1 min) + NaClO 2% (10 min), c) etanol 70% (1 min) + HgCl₂ 0,05% (10 min) e d) etanol 70% (1

min) + NaClO 2% (10 min) + HgCl₂ 0,05% (10 min). As soluções de NaClO e HgCl₂ foram acrescidas de 0,1% de Tween 20[®] e, após a desinfestação, as inflorescências foram lavadas seis vezes em água destilada esterilizada e, inoculadas fechadas em meio de cultura WPM acrescido de sacarose (20 g L⁻¹), carvão ativado (1,5 g L⁻¹) e solidificado com ágar Vetec[®] (3,5 g L⁻¹), sem adição de regulador vegetal. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo constituído de quatro tratamentos e cinco repetições com dez inflorescências por parcela.

3.1.3 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D combinado com 2-iP na indução de embriões somáticos em inflorescências

Em câmara de fluxo laminar as inflorescências coletadas no Museu Nacional de História Natural Capão da Imbuia foram desinfestadas com etanol 70% (1 min) seguido de solução de NaClO 2% (10 min), acrescido de 0,1% de Tween[®] 20. Após a desinfestação, as inflorescências foram lavadas seis vezes em água destilada esterilizada e, inoculadas em meio de cultura WPM acrescido de sacarose (20 g L⁻¹), 2,4-D (1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40 µM) combinado com 2-iP (2,5 µM) e solidificado com ágar Vetec[®] (3,5 g L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de seis tratamentos e cinco repetições com dez inflorescências por parcela.

3.1.4 Efeito do 2,4-D combinado com 2-iP e carvão ativado na indução de embriões somáticos a partir de inflorescências

As inflorescências coletadas no Museu Nacional de História Natural Capão da Imbuia foram desinfestadas em etanol 70% (1 min), seguido de solução de NaClO 2% (10 min) e posteriormente solução de HgCl₂ 0,05% (10 min). As soluções de NaClO e HgCl₂ foram acrescidas de 0,1% de Tween[®] 20. Posteriormente, as inflorescências foram lavadas seis vezes em água destilada esterilizada e inoculadas em meio de cultura WPM acrescido de sacarose (20 g L⁻¹), carvão ativado (1,5 g L⁻¹), 2,4-D (150, 300, 450 e 600 µM) combinado com 2-iP (20 µM), caseína hidrolisada (0,5 g L⁻¹) e solidificado com ágar Vetec[®] (3,5 g L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo constituído de quatro tratamentos e cinco repetições com dez inflorescências por parcela.

3.2 INDUÇÃO DE CALOS EM DISCOS FOLIARES, PECÍOLOS E GEMAS APICAIS

Os explantes foram obtidos de mudas de imbuia com idade entre 2 e 6 meses, plantadas em sacos plásticos (8 x 15 cm) contendo como substrato Plantmax[®] Florestal. As mudas foram acondicionadas em casa de vegetação do Departamento de Botânica, com nebulização intermitente de 20 s a cada duas horas. As mudas foram podadas para indução de brotações juvenis, das quais foram coletadas folhas jovens medindo de 1,5 a 2 cm com pecíolo e gemas apicais (Figura 1b). Os discos foliares, pecíolos e gemas apicais, foram submetidos a tratamentos de desinfestação com solução de etanol 70% (1 min), seguido de imersão em solução de 1% de NaClO₂ acrescido de 0,1% de Tween 20[®] (8 min). Em seguida, os mesmos foram lavados seis vezes em água destilada esterilizada e inoculados em meio de cultura para indução de embriões somáticos.

3.2.1 Efeito de diferentes tipos de explantes na indução de culturas embriogênicas

Discos foliares basais obtidos com auxílio de perfurador (7 mm de diâmetro), pecíolos (3 a 5 mm) e gemas apicais (5 mm) (Figura 1c) foram inoculados em meio de cultura WPM acrescido de sacarose (20 g L⁻¹), ANA (21,5 µM) e BAP (4,44 µM) e solidificado com Gelzan[™] CM (Sigma) (2 g L⁻¹) ou ágar (Vetec[®]) (3,5 g L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema bifatorial constituído de dois agentes geleificantes (ágar e gelrite) e três tipos de explantes e quatro repetições com dez explantes cada tratamento.

3.2.2 Efeito de diferentes auxinas na indução de culturas embriogênicas a partir de discos foliares

Discos foliares basais (7 mm de diâmetro) foram inoculados em meio de cultura WPM, acrescido de sacarose (20 g L⁻¹), caseína hidrolisada (0,2 g L⁻¹) sozinha ou combinada com ANA (10,7 e 21,5 µM) + BAP (4,44 µM) ou 2,4-D (9,05 e 18,1 µM) + BAP (4,44 µM) e solidificado com ágar Vetec[®] (3,5 g L⁻¹). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constituído de cinco tratamentos e quatro repetições com dez explantes por parcela.

3.3 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EIXOS EMBRIONÁRIOS ZIGÓTICOS MADUROS

Foram utilizados frutos maduros (com coloração violácea escura a preta) coletados nas localidades de Campina Grande do Sul. Os frutos foram despolpados manualmente e as sementes lavadas em água corrente e secadas a temperatura ambiente. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à desinfestação com solução de etanol 70% (5 min), seguido de imersão em solução de 3 a 6% de NaClO, acrescido de 0,1% de Tween 20[®], (20 min), em agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas seis vezes em água destilada e esterilizada. Com auxílio de bisturi, os eixos embrionários zigóticos maduros foram removidos e inoculados em meio de cultura de indução (Figura 1e e 1f).

3.3.1 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de embriões somáticos

Inicialmente foram feitos alguns testes preliminares para determinar a melhor concentração de 2,4-D para indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários zigóticos maduros.

No primeiro teste, os eixos embrionários zigóticos foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, carvão ativado (1,5 g L⁻¹), 2,4-D (50, 100, 150 e 200 µM) e solidificado com ágar Vetec[®] (4 g L⁻¹).

O segundo teste foi realizado utilizando o meio de cultura WPM acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, carvão ativado (1,5 g L⁻¹), 2,4-D (50, 100, 150 e 200 µM) e solidificado com ágar Vetec[®] (4 g L⁻¹).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições com dez eixos embrionários zigóticos maduros por parcela.

3.3.1.1 Manutenção de calos obtidos nos meios de cultura MS e WPM

Após 90 dias de indução em meio MS ou WPM contendo 2,4-D (50, 100, 150 e 200 µM), parte dos calos escuros foi subcultivada no mesmo meio de cultura adicionado de 2,4-D (50, 100, 150 e 200 µM) e a outra parte foi transferida para um meio de cultura com metade da concentração de 2,4-D (25; 50; 75 e 100 µM), durante 90 dias.

A manutenção dos calos brancos, obtidos nos dois meios de cultura, foi realizada da seguinte forma: metade dos calos foram cultivados em meio de cultura MS ou WPM sem regulador vegetal e a outra metade em meio de cultura contendo 10 μM de 2,4-D e 5 μM de Cin. O material foi subcultivado duas vezes neste meio de cultura. Após 60 dias, todos os calos foram subcultivados em meio de cultura WPM com a combinação de 4,52 μM de 2,4-D e 2,46 μM de 2-iP ou 22,62 μM de 2,4-D e 2,46 μM de 2-iP para proliferação das massas durante 30 dias. Após esse período, metade dos calos foi subcultivado nos mesmos meios de cultura (4,52 μM de 2,4-D e 2,46 μM de 2-iP ou 22,62 μM de 2,4-D e 2,46 μM de 2-iP) e parte em meios de cultura com a concentração de 2,4-D reduzida pela metade (2,26 μM de 2,4-D e 2,46 μM de 2-iP ou 11,62 μM de 2,4-D e 2,46 μM de 2-iP). Posteriormente todos os calos foram subcultivados para meio contendo 22,62 μM de 2,4-D e 2,46 μM de 2-iP.

3.3.2 Efeito do 2,4-D combinado com caseína hidrolisada em meio de cultura MS ou WPM

Os eixos embrionários zigóticos foram inoculados em meio de cultura WPM contendo sacarose (20 g L^{-1}), carvão ativado (1,5 g L^{-1}), 2,4-D (200 e 400 μM) combinado com caseína hidrolisada (0,5 e 1 g L^{-1}), solidificados com ágar Vetec® (3,5 g L^{-1}).

Em outro experimento, os eixos embrionários zigóticos foram inoculados em meio de cultura MS contendo sacarose (30 g L^{-1}), carvão ativado (1,5 g L^{-1}), 2,4-D (200 e 400 μM) combinado com caseína hidrolisada (0,5 e 1 g L^{-1}), solidificados com ágar Vetec® (3,5 g L^{-1}).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e constituído de quatro tratamentos com cinco repetições de dez eixos embrionários zigóticos maduros por parcela.

3.3.3 Efeito de diferentes aminoácidos na indução de embriões somáticos

Os eixos embrionários zigóticos coletados no fim de fevereiro foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com 20 g L^{-1} de sacarose, carvão ativado (1,5 g L^{-1}), 2,4-D (200 μM) sozinho ou combinado com caseína hidrolisada (0,25, 0,5 e 1,0 g L^{-1}), glutamina (0,25, 0,5 e 1,0 g L^{-1}) ou prolina (0,25, 0,5 e 1,0 g L^{-1}) e solidificados com ágar Vetec® (3,5 g L^{-1}). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez tratamentos e quatro repetições com dez eixos embrionários zigóticos maduros por parcela.

3.4 INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE EIXO EMBRIONÁRIO ZIGÓTICO IMATURO E DE SEMENTE IMATURA

Para a realização destes experimentos foram utilizados frutos imaturos (com coloração verde) coletados nas localidades de Campina Grande do Sul e Colombo (Embrapa Florestas) (Figura 1d).

Quando os eixos embrionários zigóticos imaturos foram utilizados como explantes, os frutos foram despulpados manualmente e as sementes lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à desinfestação com solução de etanol 70% (5 min), seguido de imersão em solução de 4% de NaClO, acrescido de 0,1% de Tween 20[®], (20 min), em agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas seis vezes em água destilada e esterilizada.

No experimento em que as sementes inteiras imaturas foram utilizadas como explantes, os frutos foram lavados em água corrente e em câmara de fluxo laminar, submetidos à desinfestação com solução de etanol 70% (5 min), seguido de imersão em solução de 4 % de NaClO, acrescido de 0,1% de Tween 20[®] (20 min), em agitação e em seguida lavados seis vezes em água destilada e esterilizada. Após a desinfestação o pericarpo do fruto foi removido com auxílio de pinça e bisturi e as sementes inteiras (com tegumento membranáceo) foram inoculadas em meio de cultura.

3.4.1 Efeito do 2,4-D combinado com caseína hidrolisada ou glutamina na indução de embriões somáticos

Os eixos embrionários zigóticos imaturos (0,2 a 0,4 cm) coletados no início de fevereiro foram inoculados em meio de cultura composto de sais e vitaminas do WPM, acrescido de sacarose (20 g L⁻¹), carvão ativado (1,5 g L⁻¹), 2,4-D (200 µM) sozinho ou combinado com caseína hidrolisada (0,5 e 1,0 g L⁻¹) ou glutamina (0,5 e 1,0 g L⁻¹) e solidificado com ágar Vetec[®] (4 g L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições com dez eixos embrionários por parcela.

3.4.2 Efeito do 2,4-D e da caseína hidrolisada na indução de embriões somáticos a partir de sementes imaturas

Os frutos foram coletados em meados de dezembro e as sementes, constituídas de dois cotilédones e um eixo embrionário, foram inoculadas *in vitro* para indução de embriões somáticos. O meio de cultura utilizado foi o WPM, acrescido de sacarose (20 g L^{-1}), carvão ativado ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), 2,4-D (200 e $400 \mu\text{M}$) combinado com caseína hidrolisada ($0,5$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$) e solidificado com ágar Vetec[®] ($3,5 \text{ g L}^{-1}$). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e seis repetições com dez sementes por parcela.

3.4.3 Efeito do 2,4-D e da caseína hidrolisada na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos

Os eixos embrionários imaturos (0,2 a 0,4 cm) coletados no fim de janeiro foram inoculados em meio de cultura composto de sais e vitaminas do WPM acrescido de sacarose (20 g L^{-1}), carvão ativado ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), 2,4-D (200 e $400 \mu\text{M}$), caseína hidrolisada ($0,5$ e 1 g L^{-1}) e solidificado com ágar Vetec[®] ($3,5 \text{ g L}^{-1}$). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições com dez eixos embrionários por parcela.

3.4.4 Efeito do 2,4-D, ANA e picloram na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos.

Os eixos embrionários imaturos (0,2 a 0,4 cm) coletados no fim de janeiro foram inoculados em meio de cultura, composto de sais e vitaminas do WPM acrescido de sacarose (20 g L^{-1}), carvão ativado ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), 2,4-D, ANA e picloram (200 e $400 \mu\text{M}$ de cada) e solidificado com ágar Vetec[®] ($3,5 \text{ g L}^{-1}$). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições com dez eixos embrionários por parcela.

3.5 EMBRIOGÊNESE REPETITIVA

Embriões somáticos primários em estágio globular e cordiforme obtidos de eixos embrionários zigóticos imaturos no meio de cultura WPM, contendo 200 μM de 2,4-D ou 200 μM de 2,4-D combinado com 1,0 g L^{-1} de caseína hidrolisada ou glutamina, após 90 dias foram cultivados em meio de cultura WPM contendo 20 g L^{-1} de sacarose, 3,5 g L^{-1} de ágar Vetec[®] e 22,62 μM de 2,4-D combinado com 2,46 μM de 2-iP para indução da embriogênese somática repetitiva.

3.5.1 Efeito da caseína hidrolisada e da glutamina na indução de embriões somáticos secundários

Massas embriogênicas contendo embriões somáticos globulares (200 mg) formadas em meio de cultura WPM contendo 22,62 μM de 2,4-D e 2,46 μM de 2-iP foram cultivadas em meio de cultura sem regulador vegetal, acrescido de 20 g L^{-1} sacarose, 3,5 g L^{-1} de ágar Vetec[®] e 1,0 g L^{-1} caseína hidrolisada, 1,0 g L^{-1} glutamina ou 0,5 g L^{-1} de caseína hidrolisada combinada com 0,5 g L^{-1} de glutamina. Foram realizados três subcultivos em intervalos de 30 dias. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constituído de três tratamentos e quatro repetições com 10 tubos de ensaio por parcela.

3.5.2 Efeito de combinações de ANA e BAP na indução de embriões somáticos secundários

Massas embriogênicas contendo embriões somáticos globulares (200 mg) obtidas em meio de cultura WPM, sem regulador vegetal e acrescido de 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada foram cultivadas no mesmo meio de cultura contendo 0,5 μM de ANA combinado com 5, 10 ou 20 μM de BAP. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado sendo constituído de três tratamentos e quatro repetições com 10 tubos de ensaio cada.

3.5.3 Morfoanatomia de embriões somáticos secundários

As amostras foram fixadas em glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (4%) em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,2) segundo Karnovsky (1965). Em seguida, as amostras foram desidratadas em série alcoólica (5, 10, 15, 20, 25 e 30%), seguido de 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95% com duração de 1 hora em cada tratamento. As amostras foram emblocadas em historresina (hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg) e álcool (1:1 v/v) durante 48 h. Foram realizados cortes seriados em micrótomo de rotação com espessura de 7 μm . Os cortes foram corados em azul de toluidina 0,5% (O'BRIEN *et al.*, 1965) dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), observados em microscópio óptico e fotografados em câmera digital.

3.6 MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

3.6.1 Efeito da combinação de ANA e 2-iP na maturação de embriões somáticos

Embriões somáticos globulares formados por embriogênese repetitiva em meio de cultura com caseína hidrolisada (1 g L⁻¹) foram cultivados em meio de cultura WPM, acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, 3,5 g L⁻¹ de ágar Vetec[®] e 2-iP (5, 10 e 20 μM) combinado com 0,5 μM de ANA para maturação. O delineamento foi o inteiramente casualizado com três tratamentos e quatro repetições com dez tubos de ensaio cada.

3.6.2 Efeito do PEG na maturação de embriões somáticos

Embriões somáticos em estágio globular, formados por embriogênese repetitiva em meio de cultura contendo caseína hidrolisada (1 g L⁻¹), foram transferidos para meio de cultura WPM, acrescido de sacarose (20 g L⁻¹), com PEG 6000 (0; 3,5 e 7%) e solidificado com ágar Vetec[®] (4 g L⁻¹). O delineamento foi o inteiramente casualizado com três tratamentos e quatro repetições com dez tubos de ensaio cada.

3.6.3 Efeito do PEG combinado com maltose na maturação de embriões somáticos

Embriões somáticos globulares formados por embriogênese repetitiva em meio de cultura contendo caseína hidrolisada (1 g L^{-1}) foram transferidos para meio de cultura WPM, acrescido de 7% de PEG 6000, 2% de sacarose ou maltose (2, 4 e 6%) e solidificado com 4 g L^{-1} de ágar Vetec®. As culturas foram mantidas no escuro. O delineamento foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições com dez tubos de ensaio cada.

3.7 CONVERSÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PLANTAS

Embriões somáticos em estágio cordiforme e torpedo, obtidos no meio de cultura de maturação com PEG 6000 (7%) e sacarose ou maltose, foram utilizados para o experimento de conversão. O meio de cultura utilizado foi o WPM contendo 20 g L^{-1} de sacarose, solidificado com $3,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar Vetec® e diferentes concentrações de reguladores vegetais:

- a) $115,4 \text{ } \mu\text{M}$ de GA_3 e $214,8 \text{ } \mu\text{M}$ de ANA e $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado.
- b) $11,54 \text{ } \mu\text{M}$ de GA_3 e $21,48 \text{ } \mu\text{M}$ de ANA sem carvão ativado.
- c) $5 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP e $0,5 \text{ } \mu\text{M}$ de AIB
- d) $5 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP e $1 \text{ } \mu\text{M}$ de AIB
- e) $5 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP e $2,9 \text{ } \mu\text{M}$ de GA_3
- f) $5 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP e $5,4 \text{ } \mu\text{M}$ de GA_3
- g) $0,58 \text{ } \mu\text{M}$ de GA_3 combinado com $1 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP
- h) $0,54 \text{ } \mu\text{M}$ de ANA combinado com $10 \text{ } \mu\text{M}$ de putrescina.

O GA_3 foi esterilizado por filtração e adicionado ao meio de cultura após a autoclavagem. Cada tratamento consistiu de dez tubos de ensaio contendo cinco embriões cordiformes cada. Após 30 dias foi avaliada a porcentagem de embriões convertidos.

3.8 AVALIAÇÕES

As culturas foram avaliadas a cada 30 dias, observando-se os seguintes critérios: porcentagem de contaminação fúngica, bacteriana, porcentagem de sobrevivência, sem

respostas, necrose, formação de calo (calo branco amarelado, calo branco com setores friáveis e calo preto), porcentagem de massas embriogênicas contendo embriões somáticos e número médio de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (globulares, cordiformes, torpedos e cotiledonares) formados por explante.

3.9 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem em 121°C por 20 min. Foram utilizados tubos de ensaio (25x150 mm) contendo dez ml de meio de cultura e fechados com tampa de polipropileno. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27±2°C (dia) e 18±2°C (noite), na ausência de luz (estádio de indução, embriogênese repetitiva e maturação) e sob luz fluorescente com intensidade de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h durante a conversão.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett onde as variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto a sua homogeneidade, à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o ASSISTAT 7.6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESINFESTAÇÃO E INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS

4.1.1 Efeito do NaClO na desinfestação de inflorescências

A maior porcentagem de sobrevivência das inflorescências de *Ocotea porosa*, após 30 dias foi de 50% e não foi constatada diferença estatística entre os tratamentos em nenhum dos critérios avaliados (Tabela 1, Anexo 1).

Tabela 1- Efeito do NaClO na desinfestação de inflorescências de *Ocotea porosa*, após 30 dias.

NaClO (%)	Sobrevivência (%)	Contaminação (%)	
		Fúngica	Bacteriana
1	33,3 ns	60,0 ns	6,7 ns
2	40,0 ns	50,0 ns	10,0 ns
3	50,0 ns	40,0 ns	10,0 ns
CV %	41,3	35,0	47,1

^{n.s.} Não significativo

Após 30 dias de cultivo, as inflorescências sem contaminação foram mantidas no mesmo meio de cultura e, aos 60 dias, as mesmas apresentaram necrose total e não ocorreu indução de calos e/ou formação de embriões somáticos.

4.1.2 Efeito do NaClO e HgCl₂ na desinfestação de inflorescências

Os tratamentos que continham cloreto de mercúrio (0,05%) foram eficientes na desinfestação de inflorescências de *Ocotea porosa*. Os tratamentos com 0,05% de HgCl₂ utilizado sozinho ou combinado com etanol 70% ou ainda a combinação de 0,05% de HgCl₂, NaClO e etanol 70% foram os que apresentaram os melhores resultados na desinfestação de inflorescências com sobrevivência superior a 70%. A contaminação

fúngica foi maior no tratamento sem HgCl₂ e a contaminação bacteriana foi baixa em todos os tratamentos (Tabela 2, Anexo2).

Tabela 2 - Efeito de diferentes agentes na desinfestação de inflorescências de *Ocotea porosa*, após 30 dias.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Contaminação (%)	
		Fúngica	Bacteriana
HgCl ₂ (0,05%)	70,0 a	20,0 b	10,0 ns
Etanol (70%) + NaClO (2%)	30,0 b	60,0 a	14,0 ns
Etanol (70%) + HgCl ₂ (0,05%)	70,0 a	20,0 b	10,0 ns
Etanol (70%) + NaClO (2%) + HgCl ₂ (0,05%)	80,0 a	10,0 b	8,0 ns
CV%	25,3	38,5	52,3

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

^{n.s.} Não significativo

Após 90 dias de cultivo, as inflorescências não apresentaram resposta de indução de calos e/ou embriões somáticos sendo descartadas devido a necrose total das mesmas.

4.1.3 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D combinadas com 2-iP na indução de embriões somáticos em inflorescências

A porcentagem média de sobrevivência das inflorescências foi de 55,0%, a contaminação fúngica foi de 37,3% das inflorescências e a contaminação bacteriana foi de 7,7% após 30 dias de cultivo (dados não mostrados).

Após 60 dias de cultivo, constatou-se que as concentrações de 2,4-D, combinadas com 2-iP não induziram a formação de calos e/ou embriões somáticos. A presença de 2,4-D combinado com uma citocinina não foi eficiente para causar um estresse osmótico nas células e conseqüentemente torná-las competentes embriogenicamente, apesar de Emons (1994) considerar que a adição de auxinas exógenas, principalmente 2,4-D, seja um dos principais indutores para a embriogênese somática. Além disso, o estado fisiológico do explantes também pode ter influenciado na falta de aquisição da competência embriogênica.

4.1.4 Efeito do 2,4-D combinado com 2-iP e carvão ativado na indução de embriões somáticos a partir de inflorescências

A porcentagem média de sobrevivência das inflorescências foi superior a 78,5%, indicando que a combinação de etanol 70%, seguido de imersão em solução de NaClO 2% e posteriormente em HgCl₂ 0,05% foi eficaz na desinfestação. Desta forma, as porcentagens médias de contaminação fúngica e de contaminação bacteriana foi de 12,5% e 9% respectivamente após 30 dias de cultivo (dados não mostrados).

Neste experimento, as concentrações elevadas de 2,4-D (150 a 600 µM) não induziram a formação de calos e nem de embriões somáticos. As avaliações continuaram sendo realizadas a cada 30 dias, mantendo-se os explantes por até 150 dias no mesmo meio. Esse longo período de cultivo não foi suficiente para induzir respostas embriogênicas. Embora a necrose dos tecidos tenha sido menor do que as observadas nos demais experimentos, após 150 dias as inflorescências foram descartadas devido à ausência de respostas.

4.2 INDUÇÃO DE CALOS EM DISCOS FOLIARES, PECÍOLOS E GEMAS APICAIS

4.2.1 Efeito de diferentes tipos de explantes na indução de calos

A indução de calos a partir de diferentes explantes em meio de cultura WPM contendo 21,5 µM de ANA combinado com 4,44 µM de BAP e solidificados com diferentes agentes geleificantes foi observada a partir do 15º dia de cultivo. Nos discos foliares, a indução de calos teve origem principalmente a partir da nervura central e/ou nas bordas, enquanto que, nos pecíolos, os calos se formaram nas extremidades. Constatou-se também que os calos induzidos a partir de discos foliares basais apresentavam aspecto compacto quando comparados aos calos obtidos de pecíolos e gemas apicais e, além disso, os calos apresentaram pouco crescimento nos primeiros 30 dias.

A análise de variância revelou que a interação dos fatores tipo de explantes e agentes geleificantes não foi significativa para a variável calo com coloração branca amarelada (Anexo 3).

A indução de calo com coloração branca amarelada a partir dos diferentes tipos de explantes ocorreu independentemente do tipo de agente geleificante; no entanto, a porcentagem média de indução de calo com coloração branca amarelada (43,7%) dos explantes cultivados em meio de cultura geleificado com Gelzan foi estatisticamente superior quando comparada a porcentagem média de calos com coloração branca amarelada induzida em meio de cultura geleificado com ágar (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do tipo de explante e dos agentes geleificantes utilizados para induzir a formação de calo branco amarelado em *Ocotea porosa*, após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM, adicionado de ANA (21,5 μM) e BAP (4,44 μM).

Tipos de explantes	Agentes geleificantes		Média geral
	Ágar (3,5 g L ⁻¹)	Gelzan TM (2 g L ⁻¹)	
Disco foliar basal	37,5	46,4	41,9 ns
Pecíolo	13,6	52,8	33,2 ns
Gema apical	17,5	32,1	24,8 ns
Média geral	22,86 b	43,7 a	

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na horizontal indicam a comparação de médias entre os tipos de agentes geleificantes e na vertical entre os tipos de explantes.

A análise de variância revelou que a interação entre os fatores tipos de explantes e agentes geleificantes não foi significativa para a variável calo escuro (Anexo 4).

A indução de calo com coloração escura nos diferentes tipos de explantes ocorreu independentemente do tipo de agente geleificante. A porcentagem média de indução de calo escuro (75,5%) nos explantes cultivados em meio de cultura geleificado com ágar foi estatisticamente superior à porcentagem média obtida em meio de cultura geleificado com Gelzan (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeito do tipo de explante e dos agentes geleificantes utilizados para induzir a formação de calos escuros em *Ocotea porosa*, após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM, adicionado de ANA (21,5 μM) e BAP (4,44 μM).

Tipos de explantes	Agentes geleificantes		Média geral
	Ágar (3,5 g L ⁻¹)	Gelzan TM (2 g L ⁻¹)	
Disco foliar basal	60,0	32,8	46,3 b
Pecíolo	83,9	47,2	65,6 ab
Gema apical	82,5	64,3	73,4 a
Média geral	75,5 a	48,1 b	

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na horizontal indicam a comparação de médias entre os tipos de agentes geleificantes e na vertical entre os tipos de explantes.

Ao comparar as médias dos calos com coloração escura entre os diferentes tipos de explantes, a maior porcentagem média de calo com coloração escura (73,4%) foi obtida a partir de gema apical, sendo estatisticamente superior ao disco foliar basal (Tabela 4).

Aos 60 dias de cultivo, calos brancos com setores friáveis se formaram a partir de calos branco amarelados de discos foliares basais em meio de cultivo solidificado com ágar e de pecíolos cultivados em meio com GelzanTM. Neste período, também foi observado que a porcentagem de calos escuros aumentou nos explantes cultivados em meio solidificado com ágar, parte desse aumento foi resultado do aumento de resposta dos calos e também alguns calos brancos amarelados inicialmente tornaram-se escuros (dados não mostrados).

O escurecimento desses calos brancos amarelados possivelmente foi devido à oxidação dos compostos fenólicos, uma vez que esta espécie apresenta grande quantidade destes. A obtenção de calos escuros também foi evidenciada para *Ocotea catharinensis* (VIANA; MANTELL, 1999) e *Ocotea odorifera* (FURTADO, 2010). Desta forma, fica evidente que a presença de calos escuros é uma característica do gênero *Ocotea*. Segundo Benson (2000) e Martin; Madassery (2005), os compostos fenólicos normalmente são vistos como substâncias deletérias durante a cultura *in vitro* e a exsudação e oxidação destas substâncias pode afetar negativamente os explantes, causando escurecimento e necrose, principalmente quando tecidos maduros de plantas lenhosas são utilizados. Entretanto, para a embriogênese somática já foram relatadas casos da formação de massas embriogênicas a partir de calos oxidados como em caquizeiro (CARVALHO *et al.*, 2004).

4.2.2 Efeito de diferentes auxinas na indução de calos a partir de discos foliares

A indução de calos nos discos foliares basais iniciou-se a partir do 15º dia após a inoculação em meio de cultura, sendo observados nas bordas do disco ou na nervura central. Os resultados da análise de variância da porcentagem de calos brancos amarelados, calos escuros (marrom/preto) e explantes sem respostas são apresentados no anexo 5. A indução de calos com coloração branca amarelada foi observada nos discos foliares cultivados em meio de cultura WPM acrescido de ANA ou 2,4-D (Tabela 5). Nos discos foliares cultivados em meio de cultura WPM sem regulador vegetal contendo caseína hidrolisada (0,2 g L⁻¹) não foi observada resposta após 30 dias de cultivo (Tabela 5). O mesmo foi observado nos discos foliares com relação à indução de calos com coloração escura (preto ou marrom).

O meio de cultura WPM sem regulador vegetal e acrescido de 0,2 g L⁻¹ de caseína hidrolisada apresentou a maior porcentagem de discos foliares que não responderam, ou seja, não induziram calos e/ou embriões somáticos (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito do 2,4-D e ANA combinados com 4,44 µM de BAP e 0,2 g L⁻¹ de caseína hidrolisada (CH) na indução de calos a partir de discos foliares basais de *Ocotea porosa*, após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM solidificado com ágar (3,5 g L⁻¹).

Tratamentos	Porcentagens		
	CBA	CE	SR
Controle	0,0 b	0,0 b	100,0 a
ANA (10,74 µM)	10,0 ab	59,6 a	30,4 b
ANA (21,48 µM)	9,7 ab	32,1 ab	58,2 b
2,4-D (9,05 µM)	12,8 a	58,9 a	28,6 b
2,4-D (18,1 µM)	12,4 a	55,8 a	31,8 b
CV(%)	67,6	48,3	40,8

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); SR: explantes sem resposta.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados da análise de variância da porcentagem de calos branco amarelados, calos escuros (marrom/preto) e explantes necrosados e explantes sem respostas são apresentados no anexo 6. A porcentagem de calos com coloração branca amarelada aumentou após 60 dias de cultivo em todos os tratamentos, sendo que a menor porcentagem foi constatada no meio de cultura livre de auxina (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito do 2,4-D e ANA combinados com 4,44 µM de BAP e 0,2 g L⁻¹ de caseína hidrolisada (CH) na indução de calos a partir de discos foliares basais de *Ocotea porosa*, após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM solidificado com ágar (3,5 g L⁻¹).

Tratamentos	Porcentagens			
	CBA	CE	NE	SR
Controle	2,0 b	8,0 b	40,0 a	50,0 a
ANA (10,74 µM)	30,2 a	53,3 a	16,4 b	0,0 b
ANA (21,48 µM)	33,7 a	39,6 ab	16,8 b	9,9 b
2,4-D (9,05 µM)	41,7 a	47,4 a	8,9 b	2,0 b
2,4-D (18,1 µM)	29,0 ab	50,2 a	14,4 b	6,4 b
CV(%)	54,0	43,4	50,3	55,2

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NE: necrose; SR: explantes sem respostas.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A porcentagem de calos escuros em meio de cultura com 0,2 g L⁻¹ de caseína hidrolisada e sem auxina também foi baixa (8%). No entanto, é possível constatar que a caseína hidrolisada sozinha induziu baixa porcentagem de formação total de calos e que a presença de auxinas e citocinina é fundamental para aumentar a indução de calos, embora não tenha induzido a formação de embriões somáticos (Tabela 6).

4.3 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EIXOS EMBRIONÁRIOS ZIGÓTICOS MADUROS

4.3.1 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calo

Os resultados da análise de variância da porcentagem de calos brancos amarelados, calos escuros (marrom/preto) e necrose dos eixos embrionários zigóticos são apresentados no anexo 7. A formação de calos com coloração branca foi observada nos eixos embrionários zigóticos maduros quando o meio de cultura MS foi acrescido com concentração igual ou superior a 100 µM de 2,4-D (Tabela 7). A formação de calos escuros ocorreu em todos os tratamentos contendo 2,4-D sem haver diferença significativa entre os tratamentos. A porcentagem de necrose ocorreu em até 50% dos eixos embrionários sem diferença significativa entre os tratamentos e, não houve indução de embriões somáticos após 90 dias de cultivo.

Tabela 7 - Indução de culturas embriogênicas a partir de eixos embrionários zigóticos maduros de *Ocotea porosa* cultivados em meio de cultura MS contendo sacarose (20 g L⁻¹), carvão ativado (1,5 g L⁻¹), ágar (4 g L⁻¹) e diferentes concentrações de 2,4-D, após 90 dias de cultivo.

2,4-D (µM)	Porcentagens		
	CBA	CE	NEEZ
50	0,0 b	49,9 ns	50,1 ns
100	19,8 a	36,4 ns	43,8 ns
150	29,6 a	31,0 ns	39,4 ns
200	21,1 a	38,1 ns	40,8 ns
CV (%)	61,7	46,3	46,2

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s.} Não significativo

Os resultados da análise de variância da porcentagem de calos brancos amarelados, calos escuros (marrom/preto) e necrose dos eixos embrionários zigóticos cultivados em meio de cultura WPM são apresentados no anexo 8. Os eixos embrionários maduros formaram calos com coloração branca em meio de cultura WPM acrescido com concentrações igual ou superior a 100 μM de 2,4-D. Em nenhum dos tratamentos testados foi constatada a indução e iniciação de embriões somáticos após 90 dias de cultivo (Tabela 8). Desta forma, foi possível observar que, além da composição dos meios de cultura MS e WPM ser diferente, a presença de 2,4-D não foi suficiente para causar um estresse nas células dos eixos embrionários maduros tornando-as competentes embriogenicamente.

Tabela 8 - Indução de culturas embriogênicas a partir de eixos embrionários zigóticos maduros de *Ocotea porosa* cultivados em meio de cultura WPM contendo sacarose (20 g L⁻¹), carvão ativado (1,5 g L⁻¹), ágar (4 g L⁻¹) e diferentes concentrações de 2,4-D, após 90 dias de cultivo.

2,4-D (μM)	Porcentagens		
	CBA	CE	NEEZ
50	9,5 b	15,9 b	74,6 a
100	18,3 ab	36,1 ab	45,6 ab
150	28,3 a	41,5 ab	30,2 b
200	14,4 ab	64,4 a	22,2 b
CV (%)	46,2	39,7	39,9

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os eixos embrionários zigóticos cultivados em meio de cultura WPM, acrescido de 200 μM de 2,4-D, apresentaram maior formação de calos escuros (64,4%) diferindo da menor concentração testada de 2,4-D (50 μM) e a porcentagem de eixos embrionários necrosados chegou a 74% em meio contendo 50 μM de 2,4-D diferindo significativamente do meio com 150 e 200 μM de 2,4-D (Tabela 8).

A necrose dos eixos embrionários iniciou-se após os primeiros 30 dias de cultivo em ambos os meios de cultura, MS e WPM. A necrose parece não ter sido influenciada pelas concentrações de auxina, uma vez que, no meio de cultura MS, as porcentagens foram similares em todos os tratamentos e, no meio WPM, a maior porcentagem de eixos embrionários necrosados foi observada na menor concentração de auxina testada (Tabelas 7

e 8). Esses resultados corroboram os de Furtado (2010), o qual constatou que a porcentagem de oxidação dos eixos embrionários de *Ocotea catharinensis* era observada após 30 dias de cultivo, independente da concentração de auxina em meio de cultura MS. No entanto, as concentrações de 2,4-D utilizadas por esse autor foram menores do que as do presente trabalho.

4.3.1.1 Manutenção de calos obtidos em meios de cultura MS e WPM

A manutenção das culturas nos meios com ou sem a redução do 2,4-D pela metade não induziu a formação de embriões somáticos, constatou-se apenas que os calos cultivados nos meios de cultura com as mesmas concentrações iniciais de 2,4-D (50, 100, 150 e 200 μM) apresentaram menor formação de calos com coloração escura. Na segunda redução do 2,4-D também não ocorreu formação de embriões somáticos, sendo observada somente a formação de calos escuros (dados não mostrados). Com isso, podemos observar que mesmo com a presença de concentrações mais elevadas de 2,4-D na fase de indução bem como a redução do 2,4-D durante a manutenção dos calos foi capaz de induzir a competência embriogênica nos eixos embrionários zigóticos maduros, discordando do proposto na literatura, onde vários autores (GUERRA *et al.*, 1999; HARTMANN *et al.*, 1997; GEORGE, 1993) citaram que para ocorrer a indução de culturas embriogênicas, o procedimento mais comum é a exclusão ou a diminuição da concentração de auxina, principalmente do 2,4-D como foi constatado por Carvalho *et al.* (2004) com caquiizeiro.

Os calos com coloração branca amarelada subcultivados em meio de cultura MS ou WPM contendo 10 μM de 2,4-D e 5 μM de Cin ou sem regulador vegetal também não formaram embriões somáticos e os mesmos escureceram. A única diferença observada entre os dois meios de cultura (com ou sem regulador vegetal) é que os calos cultivados no meio WPM cresceram mais em comparação àqueles cultivados em meio MS, e puderam ser subdivididos a cada novo subcultivo.

A transferência desses calos brancos amarelados para o meio WPM combinado com 4,52 μM de 2,4-D ou 22,62 μM de 2,4-D e 2,46 μM de 2-iP promoveu a formação de massas friáveis. O subcultivo dessas massas friáveis para meio com a concentração de 2,4-D igual ou reduzida pela metade (2,26; 4,52; 11,61 ou 22,62 μM) combinado com 2,46 μM de 2-iP, apresentou respostas semelhantes em todos os tratamentos testados, ou seja, houve formação de massas friáveis, porém, não ocorreu indução de embriões somáticos. Segundo

George (1993), a adição de citocininas em concentrações mais baixas do que a de auxinas em meio de cultura favoreceu a taxa de crescimento de calos embriogênicos de muitas espécies de dicotiledôneas. Esses resultados foram confirmados para *Aspidosperma polyneuron* (RIBAS *et al.*, 2000), *Araucaria angustifolia* (SANTOS *et al.*, 2008), *Arachis correntina* (VIDOZ *et al.*, 2006) e *Hevea brasiliensis* (BLANC *et al.*, 1999). Porém, em *Ocotea porosa*, apenas a proliferação de massas celulares foi favorecida pela combinação de auxina e citocinina, no entanto, sem formar embriões somáticos.

4.3.2 Efeito do 2,4-D combinado com caseína hidrolisada em meio de cultura MS ou WPM

Os resultados da análise de variância da porcentagem de calos brancos amarelados, calos escuros (marrom/preto) e necrose dos eixos embrionários zigóticos cultivados em meio de cultura MS e WPM são apresentados nos anexos 9 e 10. Os eixos embrionários cultivados em meio de cultura WPM acrescido de 200 μM de 2,4-D e 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada ou 400 μM de 2,4-D e 0,5 g L^{-1} de caseína hidrolisada apresentaram as maiores porcentagens de formação de calos brancos amarelados (Tabela 9). A formação de calos escuros não apresentou diferença estatística entre os tratamentos obtendo-se até 59% de indução. A maior porcentagem de eixos embrionários necrosados foi observada na maior concentração de 2,4-D combinada com 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada (Tabela 9).

Tabela 9 - Efeito da combinação de auxina (2,4-D) e caseína hidrolisada (CH) na indução de embriões somáticos de *Ocotea porosa*, a partir de eixos embrionários zigóticos maduros cultivados em meio de cultura MS, após 120 dias.

Tratamentos		Porcentagens		
2,4-D (μM)	CH (g L^{-1})	CBA	CE	NEEZ
200	0,5	28,2 b	59,4 ns	12,4 b
200	1,0	43,5 a	44,2 ns	12,3 b
400	0,5	53,8 a	36,5 ns	9,7 b
400	1,0	29,3 b	42,5 ns	28,2 a
CV%		36,5	35,0	49,8

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s.} Não significativo.

A maior porcentagem de eixos embrionários que formaram calos brancos amarelados ocorreu em meio de cultura WPM, acrescido de 400 μM de 2,4-D e 0,5 g L^{-1} de caseína hidrolisada. Da mesma forma que foi observada no meio MS, em meio WPM não houve diferença significativa entre os resultados de formação de calos escuros e a maior porcentagem de eixos embrionários que não responderam foi observada no tratamento de 400 μM de 2,4-D e 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada (Tabela 10).

Em ambos os experimentos com os meios de cultura MS e WPM não houve indução de embriões somáticos, após 120 dias de cultivo.

Tabela 10 - Efeito da combinação de auxina (2,4-D) e caseína hidrolisada (CH) na indução de embriões somáticos de *Ocotea porosa*, a partir de eixos embrionários zigóticos maduros cultivados em meio de cultura WPM, após 120 dias.

Tratamentos		Porcentagens		
2,4-D (μM)	CH (g L^{-1})	CBA	CE	NEEZ
200	0,5	35,6 ab	55,5 ns	8,8 b
200	1,0	22,1 b	58,5 ns	19,4 b
400	0,5	51,6 a	42,2 ns	6,2 b
400	1,0	17,9 b	37,3 ns	44,8 a
CV (%)		48,3	38,1	42,6

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s.} Não significativo.

Os meios de cultura MS e WPM apresentam diferentes composições de sais em sua formulação. Este fator associado à presença do 2,4-D juntamente com a caseína hidrolisada não foram adequados para indução de embriões somáticos. Possivelmente, a dificuldade de expressão da embriogênese somática esteja atribuída ao fato dos eixos embrionários zigóticos já estarem em estágio maduro não respondendo aos estímulos externos para induzir a competência embriogênica nos tecidos.

4.3.3 Efeito de diferentes aminoácidos na indução da embriogênese somática

Os resultados da análise de variância da porcentagem de calos brancos amarelados, calos escuros (marrom/preto) e necrose dos eixos embrionários zigóticos são apresentados no anexo 11. A indução de embriogênese somática ocorreu de forma direta e os embriões

somáticos foram observados em meio de cultura WPM, acrescido de 200 μM de 2,4-D e 1 g L^{-1} de glutamina. A indução de embriões somáticos foi observada em 3,6% das massas embriogênicas após 90 dias de cultivo e ocorreu em apenas um explante (Tabela 11). As maiores porcentagens de calos com coloração branca amarelada foram obtidas em meio de cultura na ausência de aminoácidos e acrescido de caseína hidrolisada e não houve indução de calos brancos amarelados quando o meio de cultura foi suplementado com 0,5 e 1,0 g L^{-1} de glutamina. Nos meios de cultura contendo 0,5 e 1,0 g L^{-1} de glutamina ou prolina foram observadas as maiores porcentagens de eixos embrionários necrosados (Tabela 11).

Tabela 11 - Efeito da caseína hidrolisada (CH), glutamina (GLN) e prolina (PRO) associadas com 200 μM de 2,4-D, na indução de embriões somáticos de *Ocotea porosa* a partir de eixos embrionários zigóticos maduros em meio de cultura WPM, após 90 dias.

Aminoácidos (0,25 g L^{-1})	Porcentagens				
	NES	MEES	CBA	CE	NEEZ
	0,0	0,0	20,6 abc	62,6 a	16,8 d
CH (0,25)	0,0	0,0	25,5 ab	52,2 ab	22,3 cd
CH (0,5)	0,0	0,0	31,9 a	39,4 ab	28,7 cd
CH (1,0)	0,0	0,0	30,4 a	44,0 ab	25,5 cd
GLN (0,25)	0,0	0,0	4,2 cd	57,9 a	37,9 bcd
GLN (0,5)	0,0	0,0	0,0 d	14,4 b	85,6 a
GLN (1,0)	3,0	3,6	0,0 d	26,1 ab	70,3 ab
PRO (0,25)	0,0	0,0	10,0 bcd	40,4 ab	49,6 abcd
PRO (0,5)	0,0	0,0	5,0 cd	47,5 ab	47,5 abcd
PRO (1,0)	0,0	0,0	13,1 bcd	30,0 ab	56,9 abc
CV%			49,3	42,4	36,8

NES: número médio de embriões somáticos globulares; MEES: massa embriogênica contendo embriões somáticos; CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A baixa porcentagem de indução de embriões somáticos primários é comum em muitas espécies e os resultados obtidos com *Ocotea porosa* corrobora com os de Furtado (2010) que observou baixa porcentagem de indução de embrião somático e também ocorreu em apenas um explante de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura WPM acrescido com 72 μM de 2,4-D ou 32 μM de ANA, após 40 e 80 dias respectivamente. No presente trabalho, a indução de embriões somáticos também ocorreu em apenas um dos explantes, no entanto em meio de cultura contendo uma concentração mais elevada de 2,4-D.

A adição de caseína hidrolisada, glutamina ou prolina no meio de cultura, não promoveu aumento da indução de embriões somáticos de *Ocotea porosa*. No caso de *Picea*

glauca, a adição de $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de prolina no meio de cultura foi fundamental para a iniciação de culturas embriogênicas (BARRETT *et al.*, 1997). Dal Vesco e Guerra (2001) relataram que a embriogênese somática de *Feijoa sellowiana* foi estimulada quando $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de glutamina foi adicionado ao meio de cultura.

4.4 INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE EIXOS EMBRIONÁRIOS ZIGÓTICOS IMATUROS E DE SEMENTES IMATURAS

4.4.1 Efeito do 2,4-D combinado com caseína hidrolisada ou glutamina na indução de embriões somáticos

O início dos eventos da expressão da embriogênese somática foi observado a partir do 40º dia após a inoculação em meio de cultura e a embriogênese somática indireta foi observada na maior parte dos eixos embrionários zigóticos imaturos, sendo que os embriões somáticos tiveram origem a partir de massa embriogênica friável. Aos 60 dias de cultivo, observou-se a indução de embriões somáticos apenas em um explante do meio de cultura WPM contendo $200 \mu\text{M}$ de 2,4-D combinado com 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada, obtendo-se dois embriões somáticos globulares e um em estágio cordiforme (Figura 2c) (dados não mostrados).

Os resultados da análise de variância da porcentagem de massa embriogênica contendo embriões somáticos, calo com massa friável, calo branco amarelado, calo escuro (preto ou marrom) e necrose dos eixos embrionários zigóticos são apresentados no anexo 12. Após 90 dias de cultivo, a maior porcentagem de massa embriogênica formando embriões somáticos (8,3%) foi registrada no mesmo meio de cultura (Tabela 12) e dois embriões somáticos globulares foram formados. A porcentagem de massa embriogênica formando embriões somáticos em meio de cultura com $200 \mu\text{M}$ de 2,4-D sem adição de caseína hidrolisada ou glutamina foi de 6,3% e observou-se a formação de um embrião em estágio globular. Em meio de cultura contendo $200 \mu\text{M}$ de 2,4-D combinado com 1 g L^{-1} de glutamina, a porcentagem de indução foi menor (4,2%) (Tabela 12); dois embriões globulares e um cordiforme foram obtidos, após 90 dias de cultivo.

No presente trabalho, a porcentagem máxima de indução de embriões somáticos foi de 8,3%. Esses resultados são semelhantes aos obtidos com *Ocotea odorífera*, onde a

porcentagem média de indução de embriões somáticos ocorreu em 6,5% dos explantes (SANTA-CATARINA *et al.*, 2001). Desta forma, a baixa porcentagem de indução a partir de embriões zigóticos parece ser característica de espécies do gênero *Ocotea*, apesar de também ser relatado para outras espécies como *Quercus suber* (PINTO *et al.*, 2002). Esses autores relataram que a embriogênese somática primária foi menos eficiente que a embriogênese somática secundária.

Tabela 12 - Efeito da caseína hidrolisada (CH) e da glutamina (GLN) na formação de massas celulares e de embriões somáticos em eixos embrionários zigóticos imaturos de *Ocotea porosa* cultivados em meio de cultura WPM suplementado com sacarose (20 g L^{-1}), carvão ativado ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), ágar (4 g L^{-1}) e 2,4-D ($200 \mu\text{M}$), após 90 dias.

Aminoácidos (g L^{-1})	Porcentagens				
	MEES	CMF	CBA	CE	NEEZ
Controle	6,3 ns	6,3 b	9,4 ns	40,6 ns	37,5 abc
CH (0,5)	0,0	28,5 a	7,8 ns	53,1 ns	10,5 c
CH (1,0)	8,3 ns	16,3 ab	7,4 ns	54,6 ns	13,4 bc
GLN (0,5)	0,0	0,0	5,4 ns	27,5 ns	67,1 a
GLN (1,0)	4,2 ns	0,0	3,6 ns	27,4 ns	64,8 ab
CV (%)	52,66	54,98	50,8	41,5	62,6

MEES: massa embriogênica contendo embriões somáticos; CMF: calo com massa friável; CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s.} Não significativo.

No presente trabalho, pode-se observar que a adição de fontes de aminoácidos combinados com 2,4-D não aumentou a indução de embriões somáticos de *Ocotea porosa* uma vez que, no meio de cultura sem caseína hidrolisada ou glutamina, também houve indução de embriões somáticos. Esses resultados não corroboram os de Ribas *et al.* (2000) pois a adição de caseína hidrolisada e glutamina no meio de cultura estimulou a formação e o desenvolvimento de embriões somáticos de *Aspidosperma polyneuron*, com concentrações semelhantes às utilizadas em *Ocotea porosa*. Zouine e Hadrami (2007) constataram que a proliferação de embriões somáticos em cultura de *Phoenix dactylifera* foi favorecida quando a glutamina foi acrescida junto com o 2,4-D. No entanto, as concentrações foram menores ($0,45 \mu\text{M}$ de 2,4-D e $0,05$ a $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de glutamina) do que as utilizadas no presente trabalho.

A maior porcentagem de calos com massa friável (28,5%) foi evidenciada no meio de cultura WPM com $200 \mu\text{M}$ de 2,4-D combinado com $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de caseína hidrolisada, após 90 dias (Tabela 12; Figura 2b). Esses resultados corroboram os de Furtado (2010), que

obteve 21,4% de calos friáveis em *Ocotea catharinensis* após 60 dias, utilizando uma concentração menor de 2,4-D (144 μM) que no presente trabalho.

A presença de calos com coloração branca amarelada ou calos escuros foi evidenciada nos diferentes tratamentos após 20 dias de indução (Figura 2a e 2d). A percentagem de calos escuros foi observada em todos os tratamentos, sem diferença significativa entre os mesmos (Tabela 12). A presença de calos escuros é uma característica da espécie, uma vez que esta apresenta grande quantidade de compostos fenólicos (SANTA-CATARINA *et al.*, 2001). De acordo com Benson (2000) e Martin e Madassery (2005), estes compostos são vistos como substâncias deletérias durante a cultura *in vitro*. No entanto, como a presença de calos escuros é comum em outras espécies do genero *Ocotea*, este fator parece não influenciar negativamente a indução de embriões.

4.4.2 Efeito do 2,4-D e da caseína hidrolisada na indução de embriões somáticos a partir de sementes imaturas

O período médio para o início dos eventos de indução e expressão da embriogênese somática a partir de sementes inteiras imaturas foi de 8 a 12 semanas após a inoculação em meio de cultura e a indução dos embriões somáticos ocorreu de forma direta, sem a formação prévia de calo. Ribas *et al.* (2000) observaram que a expressão da embriogênese somática em *Aspidosperma polyneuron* utilizando embriões zigóticos imaturos ocorreu em menor tempo (4 semanas) do que a observada no presente trabalho. Esses autores também observaram a expressão direta da embriogênese somática com embriões zigóticos imaturos. Resultados semelhantes foram obtidos com *Euterpe edulis* (GUERRA, 1989).

Os resultados da análise de variância da porcentagem de massa embriogênica contendo embriões somáticos, número médio de embriões somáticos globulares, calo com massa friável e necrose dos eixos embrionários zigóticos são apresentados no anexo 13. O meio de cultura WPM contendo a combinação de 400 μM de 2,4-D e 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolisada foi o que apresentou a maior porcentagem de indução de embriões somáticos (24,4%). O maior número médio de embriões somáticos foi observado nos meios de cultura contendo 200 μM de 2,4-D e 1 g L⁻¹ de caseína hidrolisada (4,1 embriões globulares) e 400 μM de 2,4-D e 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolisada (4,0 embriões globulares) (Tabela 13). No presente trabalho, os embriões somáticos induzidos tiveram origem apenas do eixo embrionário zigótico e não foi observada indução de embriões somáticos nos cotilédones. A

indução de calos brancos só foi constatada após a indução dos embriões somáticos e a porcentagem foi similar em todos os tratamentos (Tabela 13).

O aumento da porcentagem de explantes formando massas com embriões somáticos (até 24,4%) pode ter sido favorecido pelos nutrientes presentes nos cotilédones, quando foram utilizadas as sementes inteiras imaturas. Os tecidos de origem embrionária (eixos zigóticos) são embriogênicos por natureza, apresentando condições meristemáticas que favorecem a indução de embriões somáticos. Os tecidos imaturos possuem células competentes (determinadas para embriogênese), ou seja, são capazes de reagir a sinais específicos de desenvolvimento, conforme relatado por SCHMIDT *et al.* (1997).

Tabela 13 - Efeito da combinação de auxina (2,4-D) e caseína hidrolisada (CH) na indução de embriões somáticos de *Ocotea porosa*, a partir de sementes imaturas, após 60 dias.

2,4-D (μM)	Porcentagens			
	NES	MEES	CBA	NEEZ
200 + CH ($0,5 \text{ g L}^{-1}$)	2,8 ab	15,3 ab	29,1 ns	55,6 ns
200 + CH ($1,0 \text{ g L}^{-1}$)	4,1 a	22,1 ab	26,3 ns	51,5 ns
400 + CH ($0,5 \text{ g L}^{-1}$)	4,0 a	24,4 a	29,9 ns	45,7 ns
400 + CH ($1,0 \text{ g L}^{-1}$)	1,0 b	10,8 b	25,9 ns	63,6 ns
CV(%)	48,3	40,0	32,6	42,2

NES: número médio de embriões somáticos globulares; MEES: massa embriogênica contendo embriões somáticos; CBA: calo branco amarelado; NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

^{n.s.} Não significativo.

Neste experimento, os frutos foram coletados em meados de dezembro e a época de coleta aliada à presença dos cotilédones pode ter sido o fator que aumentou a indução da embriogênese em comparação com os frutos coletados entre a segunda quinzena de janeiro e início de fevereiro (experimento descrito em 4.4.3). Santa-Catarina *et al.* (2001) também observaram que a melhor resposta na indução de embriões somáticos de *Ocotea catharinensis* ocorreu quando os eixos embrionários zigóticos ainda não tinham completado a sua maturidade.

4.4.3 Efeito do 2,4-D e da caseína hidrolisada na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos

O padrão de expressão dos embriões somáticos ocorreu indiretamente de massas celulares com coloração branca. O período médio para o início dos eventos de indução e expressão da embriogênese somática a partir de eixos embrionários imaturos foi de 8 a 12 semanas após a inoculação em meio de cultura, semelhante ao observado no experimento em que as sementes inteiras imaturas foram utilizadas como explantes.

Os resultados da análise de variância do número médio de embriões somáticos globulares, porcentagem de massa embriogênica contendo embriões somáticos, calo branco amarelado e necrose dos eixos embrionários zigóticos são apresentados no anexo 14. A porcentagem de massas formando embriões somáticos variou de 2,5 a 3,6% diferindo dos explantes cultivados em meio de cultura contendo 200 μM de 2,4-D e 0,5 g L^{-1} de caseína hidrolisada (Tabela 14). A indução de embriões somáticos foi observada nos meios de cultura WPM acrescidos de 200 μM de 2,4-D e 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada, 400 μM de 2,4-D e 0,5 g L^{-1} ou 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada e 400 μM de 2,4-D e 1,0 g L^{-1} de caseína hidrolisada. Este último meio também apresentou maior número médio de embriões somáticos globulares (20 embriões) e 5 cordiformes (dados não mostrados) (Figura 3d).

Tabela 14 - Efeito da combinação de auxina (2,4-D) e caseína hidrolisada (CH) na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários imaturos de *Ocotea porosa*, após 90 dias de cultivo.

2,4-D (μM)	Porcentagens				
	NES	MEES	CBA	CE	NEEZ
200 + CH (0,5 g L^{-1})	0,0 b	0,0 b	5,2 b	66,7 ns	28,1 ns
200 + CH (1,0 g L^{-1})	2,0 b	2,5 a	15,0 ab	65,0 ns	17,5 ns
400 + CH (0,5 g L^{-1})	2,0 b	3,2 a	35,0 a	39,2 ns	22,6 ns
400 + CH (1,0 g L^{-1})	20,0 a	3,6 a	28,6 a	49,1 ns	18,8 ns
CV(%)	41,4	44,4	51,6	37,5	47,9

NES: número médio de embriões somáticos globulares; MEES: massa embriogênica contendo embriões somáticos; CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s.} Não significativo.

As maiores porcentagens de calos com coloração branca amarelada foram obtidas em eixos embrionários zigóticos imaturos cultivados em meio de cultura WPM contendo 400 μM de 2,4-D e 0,5 ou 1,0 g L^{-1} de caseína hidrolisada. Com relação à indução de calos

com coloração escura (preto ou marrom) e eixos embrionários necrosados, não houve diferença significativa entre os tratamentos testados (Tabela 14).

4.4.4 Efeito do 2,4-D, ANA e picloram na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos

Os resultados da análise de variância do número médio de embriões somáticos globulares, porcentagem de massa embriogênica contendo embriões somáticos, calo branco amarelado, calo escuro e necrose dos eixos embrionários zigóticos são apresentados no anexo 15. A indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos ocorreu nos meios contendo os três tipos de auxina (Tabela 15). A indução dos embriões somáticos só foi observada após 90 dias de cultivo e a expressão da embriogênese somática ocorreu de forma indireta a partir de massas com coloração branca (Figura 3a e 6c).

A maior porcentagem de indução e iniciação de embriões somáticos (10,6%) ocorreu em meio de cultura contendo 200 μM de 2,4-D, diferindo dos demais tratamentos. Neste mesmo meio de cultura foi obtido o maior número médio de embriões somáticos em estágio globular (5 embriões) (Tabela 15).

Tabela 15 - Efeito de diferentes auxinas na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários imaturos de *Ocotea porosa*, após 120 dias de cultivo.

Tratamento (μM)	NES	Porcentagens			
		MEES	CBA	CE	NEEZ
2,4-D (200)	5,0 a	10,6 a	24,9 ab	56,9 abc	7,5 b
2,4-D (400)	0,0 c	0,0 b	20,0 b	80,0 a	0,0 c
ANA (200)	1,0 bc	3,6 b	21,1 b	62,2 abc	13,1 a
ANA (400)	1,0 bc	2,5 b	16,3 b	78,9 ab	2,5 bc
PIC (200)	3,8 ab	3,1 b	54,4 ab	42,4 bc	0,0 c
PIC (400)	1,0 bc	2,8 b	63,2 a	31,2 c	2,8 bc
CV(%)	57,8	53,4	53,8	27,9	56,2

NES: número médio de embriões somáticos globulares; MEES: massa embriogênica contendo embriões somáticos; CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A indução de calos com coloração branca amarelada (Figura 3b) e escura ocorreu em todos os tratamentos testados sendo que a maior porcentagem de calos brancos

amarelados foi obtida no meio de cultura contendo 200 ou 400 μM de Picloram (Tabela 15). A necrose dos eixos embrionários ocorreu com maior frequência no meio de cultura contendo 200 μM de ANA.

Em geral, os protocolos estabelecidos de embriogênese somática com espécies do gênero *Ocotea* utilizaram o 2,4-D como fonte de auxina. Furtado (2010) testou o efeito do 2,4-D e ANA em culturas de *Ocotea catharinensis* e embriões somáticos globulares foram observados nos eixos embrionários zigóticos maduros cultivados tanto em meio de cultura WPM acrescido de ANA (36 μM) como de 2,4-D (72 μM). Esse resultado é semelhante ao encontrado com *Ocotea porosa* em que tanto o 2,4-D como o ANA induziram embriões somáticos. Embora a porcentagem de embriões somáticos globulares obtidos em meio de cultura contendo 200 μM de 2,4-D tenha sido maior daquelas obtidas em meio de cultura contendo ANA e picloram, possivelmente o 2,4-D pode ser substituído pelo ANA ou picloram. A substituição se justifica pelo fato de que o uso prolongado do 2,4-D na fase de indução pode inibir a progressão dos estádios posteriores dos embriões somáticos, além de causar anormalidade nos embriões (VON ARNOLD, 2008). Desta forma, sugere-se que novas investigações sejam realizadas com estas auxinas, a fim de observar seus efeitos no desenvolvimento posterior dos embriões somáticos. Além disso, culturas mantidas em 2,4-D podem apresentar variações genéticas. Por esses motivos, alguns pesquisadores têm preferido utilizar o ANA ou AIA, ou uma transferência de calos para um meio contendo um desses compostos, após a indução em meio com 2,4-D (MACHAKOVA *et al.*, 2008).

Em algumas espécies do gênero *Ocotea* tais como *Ocotea odorifera* (SANTA-CATARINA *et al.*, 2001) e *Ocotea catharinensis* (MOURA-COSTA *et al.*, 1993), a indução de culturas embriogênicas ocorreu em meio de cultura com altas concentrações de 2,4-D (72 a 400 μM). De um modo geral, no presente trabalho, a indução de embriões somáticos também ocorreu em meio de cultura com elevada concentração de 2,4-D (200 a 400 μM). No entanto, além da auxina, outro fator importante que contribuiu para a indução dos embriões somáticos foi o fato de utilizar eixos embrionários zigóticos imaturos como explantes. Pois em todos os experimentos realizados utilizando eixos zigóticos imaturos foi observada a formação de embriões somáticos.

4.5 EMBRIOGÊNESE REPETITIVA

Os embriões somáticos (globulares e cordiformes) obtidos na fase de indução em meio de cultura WPM contendo 200 μM de 2,4-D e 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada ou glutamina foram subcultivados para meio de cultura WPM contendo 22,62 μM de 2,4-D e 2,46 μM de 2-iP visando a proliferação massal de embriões somáticos por meio da embriogênese repetitiva. Essa combinação permitiu a indução em média de 76,9 embriões globulares, 3,4 embriões cordiformes, 1,5 embriões em estágio de torpedo e um embrião cotiledonar. Em *Ocotea catharinensis*, o cultivo de embriões globulares primários em meio de cultura contendo 18,1 μM de 2,4-D deu origem a novos embriões globulares bem como a estruturas semelhantes a embriões em estágio cotiledonar, os quais escureceram e induziram novos embriões somáticos (MOURA-COSTA *et al.*, 1993), resultados estes também observados no presente trabalho. Outros compostos adicionados no meio de cultura também foram utilizados para indução da embriogênese repetitiva. Em *Ocotea catharinensis*, a embriogênese repetitiva foi induzida a partir de embriões somáticos cotiledonares em meio WPM contendo 400 g L^{-1} de glutamina e 22,7 g L^{-1} de sorbitol (SANTA-CATARINA *et al.*, 2004, 2005). No presente trabalho, a mesma combinação de glutamina e sorbitol foram testadas e, no entanto, observou-se que houve baixa indução de embriões secundários (15 embriões somáticos globulares) e muitos destes apresentaram características anormais (dados não mostrados).

4.5.1 Efeito da caseína hidrolisada e da glutamina na indução de embriões somáticos secundários

Observou-se que a adição de 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada ao meio de cultura WPM induziu em média 61,8 novos embriões globulares e 2,0 embriões cordiformes, além de 82,5% das culturas apresentarem massas embriogênicas (Tabela 16, Anexo 16; Figura 3e).

Com a adição de 1 g L^{-1} de glutamina no meio de cultura WPM, o número médio de embriões somáticos globulares obtidos foi de 30,4 embriões e não foram observados os demais estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos. A adição combinada de caseína hidrolisada e glutamina (0,5 g L^{-1}) promoveu a formação média de 56,6 novos embriões globulares (Tabela 16).

No presente trabalho, não houve diferença estatística entre as concentrações de caseína hidrolisada ou glutamina, que foram utilizadas como fonte de aminoácidos na indução de novos embriões somáticos por embriogênese repetitiva. No entanto, Ortiz-Lopes *et al.* (2000) relataram que os aminoácidos são substâncias importantes na assimilação primária do nitrogênio e na síntese de proteínas. Segundo Morcillo *et al.* (1999) e Garin *et al.* (2000), a glutamina combinada ou não com caseína hidrolisada pode ser utilizada em diferentes estádios da embriogênese somática. A adição desses compostos no meio de cultura pode aumentar a taxa de proliferação de calos e embriões somáticos, devido a essas substâncias fornecerem maior quantidade de nitrogênio orgânico reduzido (GEORGE, 1996).

Tabela 16 - Embriogênese somática repetitiva a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos de *Ocotea porosa* em meio de cultura WPM com CH e GLN, após 30 dias de cultivo.

Aminoácidos (g L ⁻¹)	ME	ESG	ESC
CH (0,5) + GLN (0,5)	75,0 ns	56,6 ns	0,0
CH (1,0)	82,5 ns	61,8 ns	2,0
GLN (1,0)	65,0 ns	30,4 ns	0,0
CV%	13,3	33,3	

ME: porcentagem de massa embriogênica; ESG: número médio de embriões somáticos globulares; ESC: número médio de embriões somáticos cordiformes.

^{n.s.} Não significativo

O cultivo dos embriões em meio de cultura contendo 1 g L⁻¹ de caseína hidrolisada possibilitou a manutenção da competência embriogênica por meio da proliferação de massas e embriões somáticos por três anos. A manutenção de linhagens celulares embriogênicas por longos períodos tem sido relatada para muitas espécies como *Quercus suber* (HERNANDEZ *et al.*, 2003), *Vitis rupestris* (MARTINELLI *et al.*, 2001), *Ocotea odorifera* (SANTA-CATARINA *et al.*, 2001), *Ocotea catharinensis* (MOURA-COSTA *et al.*, 1993) e *Aspidosperma polyneuron* (RIBAS *et al.*, 2000). Litz *et al.* (1995) e Tulecke *et al.* (1995) relataram que a capacidade embriogênica pôde ser mantida em *Mangifera indica* e *Juglans regia* via embriogênese repetitiva por mais de 5 e 9 anos, respectivamente. Considerando a baixa indução de embriões somáticos primários a partir de embriões zigóticos, a embriogênese somática repetitiva pode apresentar algumas características importantes nesse sistema de propagação massal, por possibilitar a obtenção de elevadas taxas de multiplicação das linhagens celulares. Desta forma, o potencial dos embriões somáticos primários de produzir, nas condições de cultura adequadas, uma grande quantidade de embriões

somáticos secundários por meio da embriogênese repetitiva tem se mostrado vantajosa para manter linhagens de culturas embriogênicas em *Ocotea porosa*.

4.5.2 Efeito de combinações de ANA e BAP na indução de embriões somáticos secundários

Os resultados da análise de variância da porcentagem de massa embriogênica contendo embriões somáticos e do número médio de embriões somáticos globulares são apresentados no anexo 17. Observou-se uma evolução dos pró-embriões para o estágio globular nos meios de cultura contendo todas as concentrações de BAP combinadas com ANA sem ocorrer diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 17). O número médio de embriões somáticos em estágio globular formados durante três subcultivos variou de 70 a 95 (Tabela 17 e Figura 3f).

Tabela 17 - Embriogênese somática repetitiva a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos de *Ocotea porosa* durante três subcultivos em meio de cultura WPM suplementado com 0,5 μM de ANA combinado com BAP.

BAP (μM)	ME	ESG
5	90,0 ns	70,0 ns
10	95,0 ns	95,0 ns
20	85,0 ns	75,0 ns
CV%	10,5	18,1

ME: porcentagem de massa embriogênica; ESG: número médio de embriões somáticos globulares.

^{n.s.} Não significativo

A indução de novos embriões somáticos secundários foi observada; no entanto, estes não progrediram para os estádios tardios de desenvolvimento. O principal ponto de controle na manutenção de linhagens em ciclos repetitivos está relacionado a uma redução considerável nos níveis dos reguladores vegetais e nesta fase a auxina, além de permitir a proliferação, pode inibir o desenvolvimento de massas pró-embriogênicas em embriões somáticos (THORPE, 2000; VON ARNOLD *et al.*, 2002; FEHÉR, 2003). No entanto, no presente trabalho, foi possível manter a competência das massas embriogênicas e indução de embriões somáticos utilizando uma baixa concentração de ANA combinada com BAP.

4.5.3 Morfoanatomia de embriões somáticos secundários

No estudo morfoanatômico das estruturas obtidas em meio de cultura WPM contendo 2,4-D (22,62 μM) e 2-iP (2,46 μM), foi evidenciada a histodiferenciação dos embriões somáticos de *Ocotea porosa* (Figura 4).

Nas secções histológicas foi possível observar células calosas vacuoladas com tamanhos diferentes e maiores do que as embriogênicas. Foi observada também uma região com coloração verde-azulada, por meio da reação metacromática do azul de toluidina, indicando a presença de compostos fenólicos (Figura 4a). Na figura 4a, observou-se uma região embriogênica constituída de células isodiamétricas, citoplasma denso, núcleo proeminente e nucléolo corado de escuro evidenciando a formação de pró-embriões (pe) e a ocorrência de divisão anticlinal e periclinal (Figura 4b seta).

O primeiro estágio de desenvolvimento do embrião somático é marcado pelo início da diferenciação estrutural com a formação da protoderme que circunda o embrião globular (Figura 4c). A transição do estágio globular para cordiforme foi marcada pelo alongamento celular e início do crescimento dos cotilédones. Nessa fase, o início da formação do procâmbio também foi observado (Figura 4d), mostrando uma protoderme definida (Figura 4e) e divisões periclinais na organização do procâmbio (Figura 4f).

Na Figura 4g, foi observada a diferenciação da faixa procambial com células mais alongadas e vacuoladas e o alongamento dos cotilédones, caracterizando-se o estágio torpedo. Nessa fase, a secção longitudinal do embrião no estágio torpedo mostrou simetria bilateral com a formação dos cotilédones. Ficou evidente a deposição de compostos fenólicos nas camadas mais externas, ocasionando a degradação das células. A Figura 4h mostra um embrião somático em estágio cotiledonar. Observou-se a presença de tecido meristemático organizado iniciando a formação do meristema apical caulinar, no entanto não ocorreu a formação do meristema apical radicular (Figura 4i). Segundo Dodeman *et al.* (1997), para que a embriogênese somática seja concluída, deve haver a formação dos meristemas; no entanto, a análise histológica mostrou que os embriões somáticos de *Ocotea porosa* não completaram o desenvolvimento por não apresentarem meristema apical radicular e meristema apical caulinar pouco organizado (Figura 4i).

Embora os embriões somáticos tenham sido caracterizados até a fase cotiledonar, essas estruturas não são consideradas bipolares, uma vez que não foi observada a diferenciação do meristema apical radicular. Ribas *et al.* (2000) também observaram

ausência de diferenciação do meristema em embriões somáticos de *Aspidosperma polyneuron*.

No entanto, pelo fato dos embriões somáticos de *Ocotea porosa* terem se desenvolvido por meio de alterações morfológicas semelhantes a dos embriões zigóticos, a embriogênese somática é um sistema modelo para investigar o início do desenvolvimento das plantas.

4.6 MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS

4.6.1 Efeito da combinação de ANA e 2-iP na maturação de embriões somáticos

Os resultados da análise de variância da porcentagem de massa embriogênica, número médio de embriões somáticos globulares, cordiformes e torpedos são apresentados no anexo 18. Embriões somáticos globulares oriundos do meio de cultura com 1 g L⁻¹ de caseína hidrolisada e transferidas para meio de maturação contendo 2-iP (5; 10 e 20 µM) combinado com ANA (0,5 µM) apresentaram diferentes respostas morfogênicas (Tabela 18).

Tabela 18 - Efeito do 2-iP combinado com ANA (0,5 µM) na maturação de embriões somáticos de *Ocotea porosa* após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM.

2-iP (µM)	ME	ESG	ESC	EST
5	85,0 ns	30,7 ns	0,5 b	1,5 ab
10	92,5 ns	37,2 ns	1,0 b	1,0 b
20	90,0 ns	36,2 ns	2,8 a	3,0 a
CV%	18,2	40,1	49,1	37,7

ME: porcentagem de massa embriogênica; ESG: número médio de embriões somáticos globulares; ESC: número total de embriões somáticos cordiformes; EST: número total de embriões somáticos torpedos.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s.} Não significativo

A combinação de 20 µM de 2-iP com 0,5 µM de ANA foi a que apresentou o maior número de embriões desenvolvidos, com maior número médio de embriões em estádios cordiformes e torpedos (3 embriões) (Tabela 18). Observou-se também, em todos os

tratamentos, a indução de massas celulares embriogênicas e de embriões somáticos globulares.

A maturação é uma fase da embriogênese somática que consiste na progressão dos embriões somáticos das fases iniciais para as fases tardias. No entanto, nessas condições de maturação, houve um baixo percentual de avanço para os estádios ontogenéticos cordiforme e torpedo e não foi observado nenhum embrião na fase cotiledonar, revelando um desenvolvimento assincrônico dos mesmos, uma vez que houve a formação de embriões somáticos globulares (Tabela 18). Segundo Guerra *et al.* (1999), na fase de maturação, a estratégia empregada é a interrupção dos ciclos repetitivos de divisão celular e o fornecimento de estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para a diferenciação celular, para que os ciclos de desenvolvimento e de maturação originem um grande número de embriões somáticos maduros, de alta qualidade e capazes de se converterem em plantas. No entanto, no presente trabalho, a combinação de 2-iP e ANA não foi efetiva na maturação de embriões somáticos de *Ocotea porosa*. Carvalho *et al.* (2004) também relataram que a progressão dos embriões somáticos de caqui cultivados em meio contendo 2-iP combinado com AIB ocorreu de forma assincrônica. Guerra e Handro (1998) obtiveram embriões somáticos maduros em meio de cultura contendo 2-iP e ANA e, ao mesmo tempo, conseguiram manter a competência embriogênica das culturas de *Euterpe edulis*.

No meio de maturação de embriões somáticos de *Ocotea porosa*, foi observada a formação de alguns embriões somáticos anormais e, sobre os mesmos, houve a formação de novos embriões somáticos globulares. Possivelmente, a formação de embriões anormais seja devido ao tempo de permanência dos embriões somáticos em meio de cultura contendo 2,4-D, durante a embriogênese somática secundária. Além disso, a dificuldade de progressão do processo ontogênico dos embriões somáticos pode ser atribuída ao efeito residual do 2,4-D no meio de cultura (ATTREE; FOWKE, 1993). Titon *et al.* (2007) também relataram a falta de sincronização no desenvolvimento bem como a formação de embriões somáticos anormais de *Eucalyptus grandis*.

As massas celulares embriogênicas e os embriões somáticos cultivados em meio com ANA e 2-iP, após três subcultivos foram transferidas para mesmo meio de cultura, adicionado de 1 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, a fim de melhorar a porcentagem de maturação. No entanto, observou-se que a adição de caseína hidrolisada não promoveu efeito adicional na maturação dos embriões somáticos, uma vez que foram observados resultados semelhantes aos registrados quando o ANA foi combinado com 2-iP. Porém, foi constatado que a indução de massas celulares e de embriões somáticos após vários

subcultivos em meio de cultura com ANA, 2-iP e a caseína hidrolisada, foi mantida, embora a porcentagem de embriões somáticos maduros tenha sido reduzido. Tais observações também foram feitas por Dal Vesco (1998) e Ribas *et al.* (2000). Dal Vesco (1998) relatou que as culturas de *Feijoa sellowiana* mantidas em meio de cultura com 2,4-D apresentavam proliferação contínua, porém sem haver maturação dos embriões somáticos. Segundo Ribas *et al.* (2000), o subcultivo de embriões somáticos de *Aspidosperma polyneuron* durante 9 meses reduziu a expressão e o desenvolvimento de embriões somáticos sem que ocorresse redução na proliferação de massas celulares embriogênicas.

4.6.2 Efeito do PEG na maturação de embriões somáticos

Os resultados da análise de variância da porcentagem de massa embriogênica, número médio de embriões somáticos globulares, cordiformes e torpedos são apresentados no anexo 19. A formação de embriões somáticos cordiforme, torpedo e cotiledonar só foi observada após 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM contendo PEG 6000 (Tabela 19). O meio de cultura suplementado com 7% de PEG 6000 apresentou embriões maduros em todos os estádios de desenvolvimento (Figura 5a e 5b).

Tabela 19 - Efeito do PEG 6000 na maturação de embriões somáticos de *Ocotea porosa* após 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM.

PEG 6000 (%)	ME	ESG	ESC	EST	ESCOT
0	80,0 ns	35,0 ns	0,0 b	0,0 c	0,0 b
3,5	90,5 ns	23,8 ns	1,0 a	1,0 b	0,0 b
7,0	95,0 ns	25,6 ns	1,0 a	2,0 a	2,0 a
CV%	9,2	45,0	56,5	31,3	70,7

ME: porcentagem de massa embriogênica; ESG: número médio de embriões somáticos globulares; ESC: número médio de embriões somáticos cordiformes; EST: número médio de embriões somáticos torpedos; ESCOT: número médio de embriões somáticos cotiledonares.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

^{n.s.} Não significativo.

A adição de 3,5% de PEG 6000 induziu a formação de embriões somáticos nos estádios globular, cordiforme e torpedo. Na ausência de PEG 6000 no meio de cultura, apenas novos embriões globulares se formaram e em todos os tratamentos foi observada a formação de massas celulares embriogênicas.

Possivelmente, o potencial osmótico negativo proporcionado pelo PEG no meio de cultura foi o responsável pela maturação dos embriões somáticos. Segundo Raghavan (1976), o fluido do saco embrionário dos embriões zigóticos apresenta alto potencial osmótico, e a adição de PEG no meio de cultura simula para os embriões somáticos condições semelhantes às do saco embrionário.

O efeito do PEG na maturação de embriões somáticos já foi relatado para outras espécies como *Abies numidica* (VOOKOVÁ; KORMUTÁK, 2002), *Abies cephalonica* (KRAJŇÁKOVÁ *et al.*, 2009), *Pinus taeda* (LI *et al.*, 1998), *Aspidosperma polyneuron* (RIBAS *et al.*, 2000) e, nesses casos, as concentrações de PEG testadas foram de até 10%. Os melhores resultados obtidos na maturação dos embriões somáticos de *Hevea brasiliensis* foram com a adição de 14 ou 17,8% de PEG no meio de cultura, concentrações maiores que as testadas para *Ocotea porosa* no presente trabalho.

Em *Ocotea odorifera* o desenvolvimento de embriões somáticos ocorreu em meio de cultura sem adição de regulador vegetal (SANTA-CATARINA *et al.*, 2001), no entanto, no presente trabalho, o tratamento testemunha não promoveu o desenvolvimento dos embriões somáticos.

4.6.3 Efeito do PEG combinado com maltose na maturação de embriões somáticos

Os resultados da análise de variância da porcentagem de massa embriogênica, número médio de embriões somáticos globulares, cordiformes e cotiledonares são apresentados no anexo 20. A maturação dos embriões somáticos não foi dependente do tipo de carboidrato adicionado no meio de cultura. Após 30 dias de cultivo, observou-se apenas a formação de estruturas globulares e, somente após 45 dias de cultivo, houve desenvolvimento de embriões somáticos em estágio cordiforme e cotiledonar em todos os tratamentos, mas só na presença de 6% de maltose houve formação de embriões torpedos (Tabela 20).

O número médio de embriões globulares e cordiformes não apresentou diferença estatística entre os tratamentos testados, ao passo que os embriões cotiledonares foram obtidos em meio de cultura contendo 2% de sacarose ou 4 a 6% de maltose (Tabela 20; Figura 5c). No presente trabalho, a substituição da sacarose por maltose não aumentou o número de embriões somáticos maduros. Ao contrário, em algumas espécies como *Castanea sativa* (CORREDOIRA *et al.*, 2003), a maltose foi necessária para a maturação

dos embriões somáticos e para a conversão dos embriões em plantas. A maltose é o sacarídeo mais comumente utilizado para a maturação (TAUTORUS *et al.*, 1991), enquanto a sacarose é fundamental para a proliferação de embriões somáticos.

Tabela 20 - Efeito da sacarose e maltose na maturação de embriões somáticos de *Ocotea porosa* após 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM com 7% de PEG 6000.

Tratamentos	ME	ESG	ESC	EST	ESCOT
2% sacarose	97,5 ns	20,5 ns	3,0 ns	0,0	3,0 a
2% maltose	91,5 ns	21,9 ns	2,1 ns	0,0	1,0 b
4% maltose	92,5 ns	15,3 ns	2,6 ns	0,0	2,0 ab
6% maltose	91,0 ns	34,0 ns	1,5 ns	1,0	2,0 ab
CV%	7,8	48,7	48,8		28,3

ME: porcentagem de massa embriogênica; ESG: número médio de embriões somáticos globulares; ESC: número médio de embriões somáticos cordiformes; EST: número médio de embriões somáticos torpedo; ESCOT: número médio de embriões somáticos cotiledonares.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s.} Não significativo.

O efeito do PEG e da maltose na maturação de embriões somáticos já foi relatado para outras espécies. A adição de PEG (7,5 a 10%) e maltose (3 a 6%) no meio de cultura *Abies numidica* aumentou significativamente a maturação dos embriões somáticos (VOOKOVÁ; KORMUTÁK, 2002). Concentrações similares as utilizadas para *Abies numidica* foram testadas na maturação de embriões somáticos de *Ocotea porosa*, no entanto, a combinação de PEG e maltose não foi eficiente para esta espécie. Li *et al.* (1998) relataram que o meio de cultura suplementado com maltose (4%) e PEG (6%) resultou num eficiente aumento da maturação dos embriões somáticos de *Pinus taeda*. Essa combinação de PEG e maltose, além de promover a maturação, melhorou a morfologia dos embriões cotiledonares. Em *Ocotea porosa*, além do PEG e maltose não aumentar a porcentagem de maturação foram observados embriões somáticos com aspecto anormal.

A maturação representa uma fase muito importante, quando a estrutura embrionária é estabelecida e compostos de armazenamento são depositados para posteriormente serem utilizados em outras fases de desenvolvimento. Em algumas espécies, como *Picea mariana* e *Picea rubens* (TREMBLAY; TREMBLAY, 1991) e *Picea glauca* (LU; THORPE, 1987) a alta concentração de sacarose no meio de maturação foi melhor para produção de embriões somáticos. No presente trabalho foi realizado um teste preliminar com altas concentrações de sacarose (20 a 80 g L⁻¹) combinada com 17,75 µM de BAP; no entanto, foi observada

apenas a indução de novos embriões globulares e não houve progressão dos mesmos para os estádios tardios de desenvolvimento.

Neste trabalho, uma das principais limitações do processo embriogênico de *Ocotea porosa* foi a baixa taxa de maturação dos embriões somáticos e, conseqüentemente, a ausência de conversão dos mesmos.

4.7 CONVERSÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PLANTAS

Não ocorreu progressão do estágio cordiforme para cotiledonar dos embriões somáticos de *Ocotea porosa* em meio de cultura WPM suplementado com 115,4 μM de GA_3 e 214,8 μM de ANA na presença de 1,5 g L^{-1} de carvão ativado ou 11,54 μM de GA_3 combinado com 21,48 μM de ANA sem carvão ativado. Após 20 dias de cultivo, foi possível observar que os embriões somáticos escureceram e novos embriões somáticos globulares apareceram na superfície dos mesmos mantendo a embriogênese repetitiva.

Outras concentrações e tipos de reguladores vegetais foram testados (5 μM de BAP combinado com 0,5 ou 1 μM de AIB e 2,9 ou 5,4 μM de GA_3) objetivando a conversão dos embriões somáticos em plantas. No entanto, isso não ocorreu e observou-se a formação de massas celulares e embriões somáticos globulares. A ausência de conversão dos embriões somáticos possivelmente tenha ocorrido pelo efeito residual do 2,4-D, devido ao tempo de permanência dos embriões no meio de cultura de indução bem como na multiplicação dos embriões somáticos na embriogênese repetitiva. Outro fator que pode ter dificultado a conversão dos embriões somáticos de *Ocotea porosa*, é a falta de maturidade fisiológica e morfológica, as quais são necessárias para conversão em planta.

No meio de cultura de conversão contendo 0,58 μM de GA_3 combinado com 1 μM de BAP houve a formação de novos embriões somáticos globulares e um embrião em estágio torpedo (Figura 5d). Quando o meio de cultura foi acrescido de 0,54 μM de ANA combinado com 10 μM de putrescina, apenas foi observada a formação de massa embriogênica com embriões globulares na superfície (Figura 5e). Vários fatores limitam a conversão dos embriões em plantas, sendo que os mais importantes são: a má qualidade e maturação incompleta dos embriões somáticos bem como a germinação prematura dos embriões somáticos (CHOI; JEONG, 2002; CHOUDHARY *et al.*, 2009; RAI *et al.*, 2009).

5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir que a indução de embriões somáticos de *Ocotea porosa* pode ser obtida em meio de cultura WPM suplementado com 200 μM de 2,4-D acrescido de 0,5 g L^{-1} de caseína hidrolisada. A maior indução e expressão da embriogênese somática foram obtidas a partir de eixo embrionário zigótico imaturo e sementes imaturas (Figura 6).

A embriogênese somática repetitiva permitiu o estabelecimento de linhagens celulares embriogênicas, as quais foram mantidas por três anos. Nesta fase, ocorreu alta proliferação de embriões somáticos em comparação com a embriogênese somática nas culturas primárias. A embriogênese somática repetitiva de *Ocotea porosa* pode ser induzida e mantida em meio de cultura WPM contendo 0,5 μM de ANA combinado com 10 μM de BAP ou no mesmo meio de cultura sem regulador vegetal e acrescido de 0,5 g L^{-1} de caseína hidrolisada. Os embriões somáticos apresentaram sequência ontogenética semelhante à dos embriões zigóticos. Contudo, a maturação dos embriões somáticos de *Ocotea porosa* ocorreu em poucos embriões, foi assíncrona e não foi possível controlar os fatores que levam à conversão dos embriões somáticos em plantas.

6 RECOMENDAÇÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram a necessidade de experimentos futuros visando à otimização da embriogênese somática de *Ocotea porosa*, para o estabelecimento completo do protocolo de regeneração *in vitro* dessa espécie. Desta forma, recomenda-se:

- a) A realização de novos experimentos utilizando sementes inteiras imaturas como fonte de explantes associado a diferentes tipos de auxinas como ANA e Picloram, pois os mesmos apresentaram resultados semelhantes ao 2,4-D na indução de embriões somáticos de *Ocotea porosa* visando otimizar esta etapa e minimizar o efeito residual do 2,4-D nas etapas de maturação e de conversão dos embriões somáticos em plantas.
- b) A realização de experimentos com tratamentos pulso de auxinas comparando com a presença contínua deste regulador vegetal na indução e iniciação de embriões somáticos.
- c) A realização de experimentos em meio de cultura líquido para manutenção da embriogênese somática repetitiva.
- d) A avaliação do efeito do ABA associado ou não ao PEG visando sincronizar e aumentar a maturação dos embriões somáticos para obtenção de plantas regeneradas.
- e) Realizar estudos histológicos mais aprofundados em todas as etapas da embriogênese somática, para melhor compreensão dos fatores que controlam a indução e expressão da embriogênese somática.

7 REFERÊNCIAS DE LITERATURA

AMMIRATO, P.V. Patterns of development in culture. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.J. HOLLANENDER, A. Tissue culture in forestry and agriculture. New York: Plenum Press, p.9-31, 1985.

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

BAKER, C.M.; WETZSTEIN, H. Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 40, p. 249-254, 1995.

BARRETT, J.D.; PARK, Y.S.; BONGA, J.M. The effectiveness of various nitrogen sources in White spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 411-415, 1997.

BECRAFT, P.W. Receptor kinases in plant development. *Trends Plant Science*, v. 3, p. 384 – 388, 1998.

BENSON, E.E. *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 36, p. 141-148, 2000.

BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C.J.; MALUF, A.M. Germinação de diásporos de canela (*Ocotea corymbosa* (Meissn.) Mez – Lauraceae) em função da temperatura, do substrato e da dormência. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 1, p. 189-194, 1998.

BLANC, G.; MICHAUX-FERRIÈRE, C.; TEISSON, C.; LARDET, L.; CARRON, M.P. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, p. 103-112, 1999.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C. **Embriogênese somática e sementes sintéticas em *Feijoa sellowiana*: sistema referência e aspectos fisiológicos e morfo-histológicos**. 2002. 38 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Programa de Pós-em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

CANHOTO, J.M.; LOPES, M.L.; CRUZ, G.S. Somatic embryogenesis in Bay Laurel (*Laurus nobilis*). In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. Somatic Embryogenesis in woody plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 4, p. 341-367, 1999.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo, PR.: EMBRAPA FLORESTAS, v.1, 2003, 1039 p.

CARVALHO, D.C.; BIASI, L.A.; RIBAS, L.L.F.; TELLES, C.A.; ZANETTE, F. Embriogênese somática do caqui. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 280-283, 2004.

- CASTELLA, P.R.; BRITZ, R.M. **A floresta com araucária no Paraná: conservação e diagnóstico dos remanescentes florestais**. Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2004.
- CASTILLO, B.; SMITH, M.A.L. Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. **Plant Cell Report**, v. 16, p. 385-388, 1997.
- CHALUPA, V. Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp.). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. **Somatic embryogenesis in woody plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 5, p. 31-43, 1999.
- CHEE, R.P.; CANTLIFFE, D.J. Somatic embryos in sweet potato. In: HILL, W.A.; BONSI, C. K.; LORETAN, P.A. (Eds.) **Sweet potato technology for the 21th century**. Tuskegee, p. 39-46, 1992.
- CHOI, Y.E.; YANG, D.C.; PARK, J.C.; SOH, W.Y.; CHOI, K.T. Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone free medium. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 544 – 551, 1998.
- CHOI, Y.E.; KO, S.K; LEE, K.S.; YOON, E.S. Production of plantlets of *Eleutherococcus sessiliflorus* via somatic embryogenesis and successful transfer to soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 201- 204, 2002.
- CHOUHARY, K.; SINGH, M.; RATHORE, M.S.; SHEKHAWA, N.S. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration in moth bean [*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechal]: a recalcitrant grain legume. **Plant Biotechnology Report**, v. 3, p. 205–11, 2009.
- CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. Proliferation, Maturation and Germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. **Annals of Botany**, v. 92, p. 129-136, 2003.
- DAL VESCO, L.L. **Indução e controle da embriogênese somática *in vitro* na goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.)**. Florianópolis, 1998. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, 108 p.
- DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. the effectiveness of nitrogen sources in feijoa somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, n. 1, p. 19-25, 2001.
- De KLERK, G.J.; ARNHOLDT-SCHMITT, B.; LIEBEREI, R.; NEUMANN, K.H. Regeneration of roots, shoots and embryos and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. **Biologia Plantarum**, v. 39, p. 53 – 66, 1997.
- DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 1493-1509, 1997.
- EKE, C.R.; AKOMEAH, P.; ASEMOTA, O. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristems tissues from ‘zebia’ and ‘loko’ landraces. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 244-246, 2005.

EMONS, A.M.C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 43, p. 1–14, 1994.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology and Systematic**, v. 34, p. 487-515, 2003.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; MISKOLCZI, P.; AYAYDIN, F.; DUDITS, D. Induction of the embryogenic pathway in somatic plant cells. **Acta Horticulturae**, v. 15, p. 485–496, 2001.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; ÖTVÖS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**, v. 57, p. 5–12, 2002.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201–228, 2003.

FURTADO, M.B. **Indução e controle da embriogênese somática em *Ocotea catharinensis* e *Ocotea odorifera* (Lauraceae)**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OGIMA, K. Plant Cell Cultures. I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GARCIA-MARTIN, G.; MANZANERA, J.A. GONZALES-BENITO, M.E. Effects of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, p. 171-177, 2005.

GARIN, E.; BERNIER-CARDOU, M.; ISABEL, N.; KLIMASZEWKA, K.; PLOURDE, A. Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, p. 27-37, 2000.

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics Limited: England, 2nd Edition, v.2, 1996.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1: The Technology, Great Britain: Exegetics Limited, 574 p, 1993.

GEORGE, E.F.; DE KLERK, G.J. The Components of Plant Tissue Culture Media I : Macro- and Micro-Nutrients. IN: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. The Background, v.1, 3rd, 2008.

GREY, D.J.; PUROHIT, A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. **Critical Review in Plant Science**, v. 10, p. 33-61, 1991.

GUERRA, M.P. **Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. (Palmae)**. São Paulo 1989. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Botânica). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research**, v. 111, p. 65-71, 1998.

GUERRA, P.M.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, A.T. Embriogênese somática e semente sintética. In: TORRES, A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 533-568, 1999.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O.; PEIXOTO, M.L.; QUINTA, M. Embriogênese somática e micropropagação do palmito. **Sellowia**, v. 49-52, p. 150-162, 2000.

GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; REIS, M.S.; SCHNEIDER, L. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (Orgs). Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais. **Editora Senac São Paulo**, p. 85-101. 2002.

GUPTA, P.K.; PULLMAN, G.S. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. **US patent**, v. 5, p. 36 – 37, 1991.

HANAI, L.R.; FLOH, E.I.S.; FUNGARO, M.H.P.; SANTA-CATARINA, C.; PAULA, F.M.; VIANA, A.M.; VIEIRA, M.L.C. Methylation patterns revealed by MSAP profiling in genetically stable somatic embryogenic cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 368-377, 2010.

HERNÁNDEZ, I.; CELESTINO, C.; ALEGRE, J.; TORIBIO, M. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis: II. Plant regeneration from selected cork oak trees. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 765–770, 2003.

HERTEL, R.J.G. Estudos sobre *Phoebe porosa* (Nees) Mez II. A inflorescência, a flor e o fruto da imbuia. **Acta Biológica Paranaense**, v. 3, p. 25-53, 1974.

HITA, O.; GALLEGO, P.; VILLALOBOS, N.; LANAS, I.; BLAZQUEZ, A.; MARTIN, J.P.; FERNANDEZ, J.; MARTIN, L.; GUERRA, H. Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p.13-18, 2003.

IANTCHEVA, A.; SLAVOV, S.; PRINSEN, E. Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pre-treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.81, p.37-43, 2005.

IBAMA. **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. Instrução Normativa de setembro de 2008.

IKEDA, M.; UMEHARA, H. Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. **Plant Biotechnology**, v. 23, p. 153-161, 2006.

INOUE, M.T.; PUTTON, V. Macropropagação de 12 espécies arbóreas da floresta ombrófila mista. **Floresta**, v. 37, p. 55-61, 2007.

JIMÉNEZ, V.M. regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.13, n.2, p.196-223, 2001.

JIMÉNEZ, V.M. Involvement of Plant Hormones and Plant Growth Regulators on *in vitro* Somatic Embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, n. 2-3. p. 91-110, 2005.

JÜRGENS, G. Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis. **EMBO Journal**, v. 20, p. 3609–3616, 2001.

KALIL-FILHO, A.N; SOUZA, V.A de; MARZOLLO, L.G.; HIRANO, E. Dinâmica da Germinação de sementes de progênes de populações de imbuia (*Ocotea porosa* Nees et Martius ex. Nees, Lauraceae) do Paraná e de Santa Catarina. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 48, p. 121-128, 2004.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in eletron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

KLEIN, R.M. Os tipos florestais com *Araucaria* em Santa Catarina. Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Botânica. **Sociedade Botânica do Brasil**, p. 97-100, 1985.

KOMAMINE, A.; MURATA, N.; NOMURA, K. Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures – morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 41, p. 6-10, 2005.

KONIECZNY, M, R.; PILARSKA, M.; TULEJA, M.; SALAJ, T.; ILNICKI, T. Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryos of *Trifolium nigrescens* (Viv.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 123-130, 2010.

KRAJŇÁKOVÁ , J.; HÄGGMAN, H.; GÖMÖRY, D. Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, p. 251-262, 2009.

LAMB, C.R C.; MILACH, S.C.; PASQUALI, G.; BARRO, RS. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 123-130, 2002.

LEA, P.J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C (eds). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Wiley & Sons, New York, pp 155–180, 1993.

LEA, P.J.; SODEK, L.; PARRY, M.A.J.; SHEWRY, P.R; HALFORD, N.G. Asparagine in plants. *Annals of applied biology*, v. 150, p. 1-26, 2006

LI, X. Y.; HUANG, F.H.; MURPHY, B.J.; GBUR-JR, E.E. Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 34, p. 22-26, 1998.

LITZ, R.E.; MOON, P.A.; MATHEWS, H.; JAYASANKAR, S.; MONSALUD, M.J.; PLIEGO-ALFARO, F. Somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L.). In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. (eds). **Somatic embryogenesis in woody plants, Angiosperms**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 2, p. 341-357, 1995.

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. Recent advances in biotechnology for conservation and management. **International Foundation for Science**, p. 232-243, 1998.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; OLIVEIRA, M.S.P. MEDEIROS-FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 601-603, 2002.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceeding**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LU, C.Y.; THORPE, T.A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in cultured immature embryos of *Picea glauca*. **Journal of Plant Physiology**, v. 128, p. 297-302; 1987.

MACHAKOVA, I.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E.F. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. IN: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, J. **Plant propagation by tissue culture**, 3 ed. 2008.

MADAKADZE, R.M.; SENARATNA, T. Effect of growth regulators on maturation of geranium (*Pelargonium X hortorum*) somatic embryos. **Plant Growth Regulation**, v. 30, p. 55-60, 2000.

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

MARTINELLI, L.; CANDIOLI, E.; COSTA, D.; POLETTI, V.; RASCIO, N. Morphogenic competence of *Vitis rupestris* S. secondary somatic embryos with a long culture history. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 279-284, 2001.

MAY, R.A.; TRIGIANO, R.N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. **Jounal American Society Horticulturæ Science**, v. 116, p. 366-371, 1991.

MEDEIROS, J.D.; SAVI, M.; BRITO, B.F.A. Seleção de áreas para criação de Unidades de Conservação na Floresta Ombrófila Mista. **Biotemas**, v. 18 p. 33-50, 2005.

MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht:: Kluwer Academic, p. 155-203, 1995.

- MICHAUX-FERRIÈRE, N.; SCHWENDIMAN, J. Histology of somatic embryogenesis. In: DATTÉE, Y.; DUMAS, C.; GALLIS, A. (Eds.). **Reproductive biology and plant breeding**. Biotrop-CIRAD: Springer-Verlag, p. 247-259, 1992.
- MORCILLO, F.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; NOIROT, M.; HAMON, S.; DUVAL, Y. Differential effects of glutamine and arginine on 7S globulin accumulation during the maturation of Oil Palm somatic embryos. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 868-872, 1999.
- MORDHORST, A.P.; TOONEN, M.J. DE VREIS, S. Plant embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 16, p. 535 – 576, 1997.
- MOSER, J. R.; GARCIA, M. G.; VIANA, A. M. Establishment and growth of embryogenic suspension cultures of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 37-42, 2004.
- MOURA-COSTA, P.H.; VIANA, A.M.; MANTELL, S.H. *In vitro* plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis*, an endangered Brazilian hardwood forest tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 279-286, 1993.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p.473-497, 1962.
- NIEVES, N.; MARTÍNEZ, M.E.; CASTILLO, R.; BLANCO, M.A.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J.L. Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 15-21, 2001.
- NICKLE, T.C.; YEUNG, E.C. Further evidence of a role for abscisic acid in conversion of somatic embryos of *Daucus carota*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 30, p. 96-103, 1994.
- NISHIWAKI, M.; FUJINO, K.; KODA, Y.; MASUDA, K.; KIKUTA, Y. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta**, v. 211, p. 756-759, 2000.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1965.
- ORTIZ-LOPEZ, A.; CHANG, H.C.; BUSH, D.R. Amino acid transporters in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1465, p. 275-280, 2000.
- PAN, M.J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture-a review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 155–163, 1998.
- PARK, S.Y.; AHN, J.K.; LEE, W.Y.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.Y. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant Science**, v. 168, p. 1221-1225, 2005.

- PARROT, W.A.; MERKLE, S.A.; WILLIAMS, E.G. Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer systems. In: MURRAY, D.R. **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Melkham: Redwood., p.158-200, 1991.
- PELEGRINI, L.L.; RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F; KOEHLER, H.S. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees ex Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1523-1527, 2011.
- PERÁN-QUESADA, R.; SANCHEZ-ROMERO, C.; BARCELÓ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. **Scientia Horticulturae.**, v. 102, p. 61-73, 2004.
- PERERA, P.I.P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J.L.; DOULBEAU, S.; YAKANDAWALA, D.M.D.; WEERAKOON. L.K. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 21-28, 2007.
- PEREZ-NUÑEZ, M.T.; CHAN, J.L.; SÁENZ, T.; GONZÁLEZ, T.; VERDEIL, J.L.; OROPEZA, C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L) plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 42, p. 37-43, 2006.
- PINTO, G.; VALENTIN, H.; COSTA, A.; CASTRO, S.; SANTOS, C. Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. tree. **In Vitro Cellular Development Biology - Plant**, v. 38, n.6, p. 569–572, 2002.
- PINTO, G.; SILVA, S.; PARK, Y.S.; NEVES, L.; ARAUJO SANTOS, C. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globules* Labill.: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 79–88, 2008.
- PLIEGO-ALFARO, F. Development of an *in vitro* rooting bioassay using juvenile- phase steam cutting of *Persea americana*. **Journal Horticulture Sciences**, v. 63, p. 295 – 301, 1988.
- PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 12, p. 61-66, 1988.
- PULLMAN, G.S.; BUCHANAN, M. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.): stage-specific analyses of zygotic embryo and female gametophyte tissue. **Plant Science**, v. 164, p. 943 – 954, 2003.
- QUEIROZ-FIGUEROA, F. R.; ROJAS-HERRERA, F.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p.285–301, 2006.
- RAGHAVAN, V. **Experimental vascular embryogenesis in vascular plants**. London: Academic Press, 1976. 603p.
- RAI, M.K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 121, p. 233 – 236, 2009.

REGÔ, G.M.; LAVORANTI, O.J.; NETO, A.A. Monitoramento dos ciclos fenológicos da imbuia, no município de Colombo, Pr. **Comunicado Técnico: EMBRAPA FLORESTAS**, Colombo, 2006.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Sudesul/HBr/ Governo do Estado do Rio Grande do Sul, 1978.

RIBAS, L.L.F.; GUERRA, M.P.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L. Somatic embryogenesis in *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg. In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. (eds). **Somatic embryogenesis in woody plants**. v. 6, p. 509-537, 2000.

RUFFONI, B.; DAMIANO, C.; MASSABÒ, F.; ESPOSITO, P. Organogenesis and embryogenesis in *Lisianthus russellianus* Hook. **Acta Horticulturae**, v. 280, p. 83-87, 1990.

ROJAS-HERRERA, R.; QUEIROZ-FIGUEROA, F.R.; MONFORTE-GONZÁLEZ, M.; SÁNCHEZ-TEYER, F.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* revealed by RT-PCR differential display. **Molecular Biotechnology**, v. 21, p. 43-50, 2002.

SAGARE, A.P.; LEE, Y.L.; LIN, T.C.; CHEN, C.C.; TSAY, H.S. Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) – a medicinal plant. **Plant Science**, v. 160, p. 139 – 147, 2000.

SÁENZ, L.; HERRERA-HERRERA, G.; UICAB-BALLOTE, F.; CHAN, J.L.; OROPEZA, C. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.100, p. 301-308, 2010.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, p. 301–308, 2006.

SANCHEZ-ROMERO, C.; MARQUES-MARTÍN, B.; PLIEGO-ALFARO, F. Somatic and zygotic embryogenesis in Avocado. In: MEYIB, A.; SAMA, Y.J. Somatic embryogenesis. **Plant Cell Monographs**, v. 2, p. 271-284, 2006.

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

SANTA-CATARINA, C.; RANDI, A.M.; VIANA, A.M. Growth and accumulation of storage reserves by somatic embryos of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 67-71, 2003.

SANTA-CATARINA, C.; OLMEDO, A S.; MEYER, G.A.; MACEDO, J.; AMORIM, W.; VIANA, A.M. Repetitive somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae): effect of somatic embryo developmental stage and dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 55-62, 2004a.

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

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

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 Regulation**, v. 49, p. 237-247, 2006.

SANTOS, A.L.W.; STEINER, N.; GUERRA, M.P.; ZOGLAUER, K.; MOERSCHBACHER, B.M. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 1, p. 195-199, 2008.

SCHMIDT, E.D.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.; DE VRIES, S.C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, v. 124, p. 2049 – 2062, 1997.

SCHULTHEIS, J.R.; CHEÉ, R.P.; CANTLIFFE, D.F. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/CNPQ, p. 227-249, 1990.

SILVA, J. A.; SALOMÃO, A. N.; GRIPP, A.; LEITE, E. J. Phytosociological survey in Brazil forest genetic reserve of Caçador. **Plant Ecology**, Dordrecht, n. 133, p. 1-11, 1997.

SILVA, C.V. **Estudo morfoanatômico de embriões zigóticos e somáticos de jabuticabranca (*Myrciaria sp.*)**. 57 p. Tese (Universidade Federal de Viçosa) Viçosa, Minas Gerais 2005.

SHI, X.; DAI, X.; LIU, G.; BAO, M. Enhancement of somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.): osmotic stress and other factors affecting somatic embryos formation on hormone-free medium. **Trees**, v. 23, p. 1033 – 1042, 2009.

SMISKOVA, A.; VLASINOVA, H.; HAVEL, L. somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Schisandra chinensis*. **Biologia Plantarum**, v. 49, p. 451 – 454, 2005.

STASOLLA, C.; YEUNG, E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 15–35, 2003.

STEINMACHER, D.A.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 15-22, 2007a.

STEINMACHER, D. A. et al. somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 43, n. 2, p. 124-132, 2007b.

SUAREZ, I.E.; SCHNELL, R.A.; KUHN, D.N.; LITZ, R.E. Recovery and indexing of avocado plants (*Persea Americana*) from embryogenic nucellar cultures of an avocado sunblotch viroid-infected tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, p. 27-37, 2006.

SUN, Y.; ZHANG, X.; JIN, S.; LIANG, S.; NIE, Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschianum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 247-253, 2003.

TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L.C.; DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1873 – 1899, 1991.

TEIXEIRA, B.J.; MARBACH, P.A.S. Otimização do processo de embriogênese somática em cacau (*Theobroma cacao* L.). **Biociência: Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 100-103, 2003.

THORPE, T. A. Somatic embryogenesis: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. **Korean Journal of Plant Tissue Culture**, v. 27, p. 245–258, 2000.

THORPE, T.A.; STASOLLA, C. Somatic embryogenesis. In: BHOJWANI, S. S.; SOH, W. Y (eds). **Current trends in the embryology of angiosperms**. Kluwer Academic, Dordrecht, p. 279–336, 2001.

THORPE, T.A. *In vitro* Embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1995.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; MOTOIKE, S.Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 003, p. 417-426, 2007.

TONIN, G.A. **Efeito da época de coleta, condições de armazenamento, substratos e sombreamento na emergência de plântulas e produção de mudas de *Ocotea porosa* (Ness et Martius ex. Nees) Lauraceae e de *Sapindus saponaria* L. (Saponaceae)**. 176 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Setor de Biológicas e da Saúde, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2005.

TREMBLAY, L.; TREMBLAY, F.M. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 27, p. 95–103; 1991.

TULECKE, W.; McGRANAHAN, G.H.; LESLIE, C.A. Somatic embryogenesis in walnut (*Juglans* species). In: BAJAJ, Y P.S. (ed). **Biotechnology in agriculture and forestry, somatic embryogenesis and synthetic seed**. Springer-Verlag, v. 30, p. 370-377, 1995.

UMEHARA, M.; IKEDA, M.; KAMADA, H. Endogenous factors that regulate plant embryogenesis: recent advances. **Japanese Journal of Plant Science**, n.1, p. 1-6, 2007.

- VAN DER VALK, P.; SCHOLTEN, O.E.; VERSTAPPEN, F.; JANSEN, R.C.; DONS, J.J.M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 30, p. 181- 191, 1992.
- VAN STADEN, J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogous and antagonists. IN: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DEKLERK, G. J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. The Background, v.1, 3rd, 2008.
- VARTY, N.; GUADAGNIN, D. L. 1998. *Ocotea porosa*, em: 2008 IUCN *Red List of Threatened Species*. <www.iucnredlist.org>. Acessado em 14 de janeiro de 2009.
- VERDEIL, J.L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIERE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, v. 88, p. 9–18, 2001.
- VIANA, A.M. Somatic embryogenesis in *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae). In: MANTEL, S.H.; BRUNS, S. TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. Recent advances in biotechnology for conservation and management. **International Foundation for Science**, p. 244-253, 1998.
- VIANA, AM.; 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. Somatic embryogenesis in woody plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 5, p. 197-214, 1999.
- VICIENT, C. M.; MARTINEZ, F. X. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.1, p.1-12, 1998.
- VIDOZ, M.L.; KLUSACEK, P.; REY HY, et al. In vitro plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) through somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 111–115, 2006.
- VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233–249, 2002.
- VON ARNOLD, S. Somatic embryogenesis. IN: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DEKLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. The Background, v.1, 3rd, 2008.
- VOOKOVÁ, B.; KORMUTÁK, A. Some features of somatic embryo maturation of Algerian fir. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 38, p. 549-551, 2002.
- WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; MELHEN, T.S.; GIULIETTI, A.M.; KIRIZAWA, M. Flora fanerogâmica do estado de São Paulo. **RIMA**, São Paulo, v. 3, p. 200-201, 2003.

WANG, P.J.; HU, C.Y.; CHEN, M.H. Taiwan sassafrás. In: BAJAJ, Y. P. S. Biotechnology in agriculture and forestry. **Springer-Verlag**, p. 180-190, 1991.

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

WU, I.F.; CHEN, J.T.; CHANG, W.C. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 107-109, 2004.

ZOUINE, J.; HADRAMI, I.E.L. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 112, n. 2, p. 221–226, 2007.

FIGURAS



Figura 1 - Diferentes tipos de explantes tesados na embriogênese somática de *Ocotea porosa*. a) Inflorescências. b) Folhas jovens de planta matriz. Barra: 3,4 mm. c) Discos foliares, pecíolo, gema apical. d) Frutos imaturos Barra: 2 mm. e) Eixo embrionário zigótico. Barra: 4,2 mm. f) Eixo embrionário isolado em meio de cultura de indução. Barra: 3,9 mm.

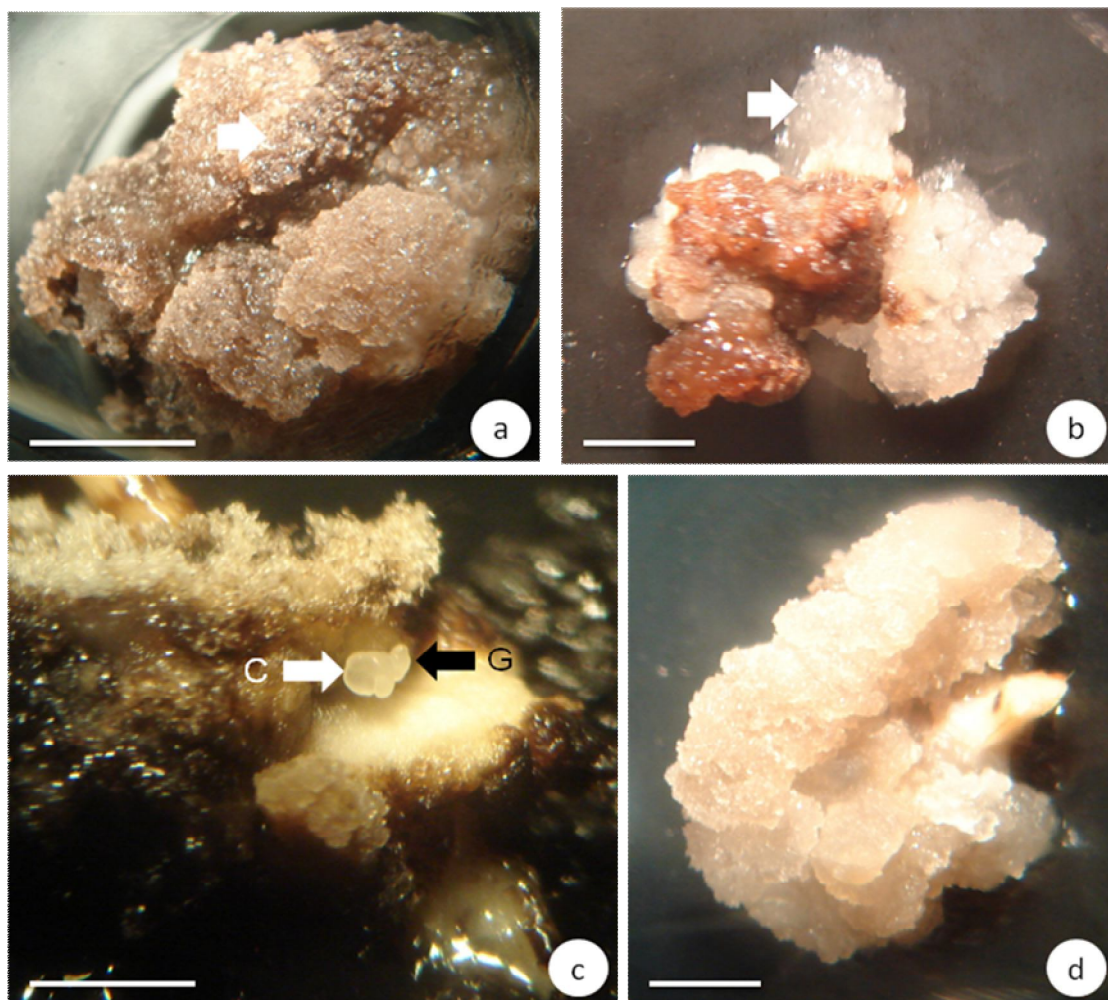


Figura 2 - a) Aspecto morfológico de calo escuro (marrom ou preto) cultivado em meio de cultura contendo 2,4-D ($200 \mu\text{M}$) após 60 dias (seta). Barra: 3,1 mm. b) Calo com massa friável (não embriogênica) obtido em meio de cultura contendo $200 \mu\text{M}$ de 2,4-D combinado com $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de caseína hidrolisada, após 90 dias (seta). Barra: 1,2 mm. c) Embrião somático em estágio globular e cordiforme (setas) obtido a partir de eixo embrionário zigótico imaturo cultivado em meio de cultura com $200 \mu\text{M}$ de 2,4-D + 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada, após 60 dias. Barra: 2,4 mm. d) Calo branco amarelado com setor friável em meio de cultura contendo $200 \mu\text{M}$ de 2,4-D combinado com $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de caseína hidrolisada, após 90 dias. Barra: 1,6 mm.

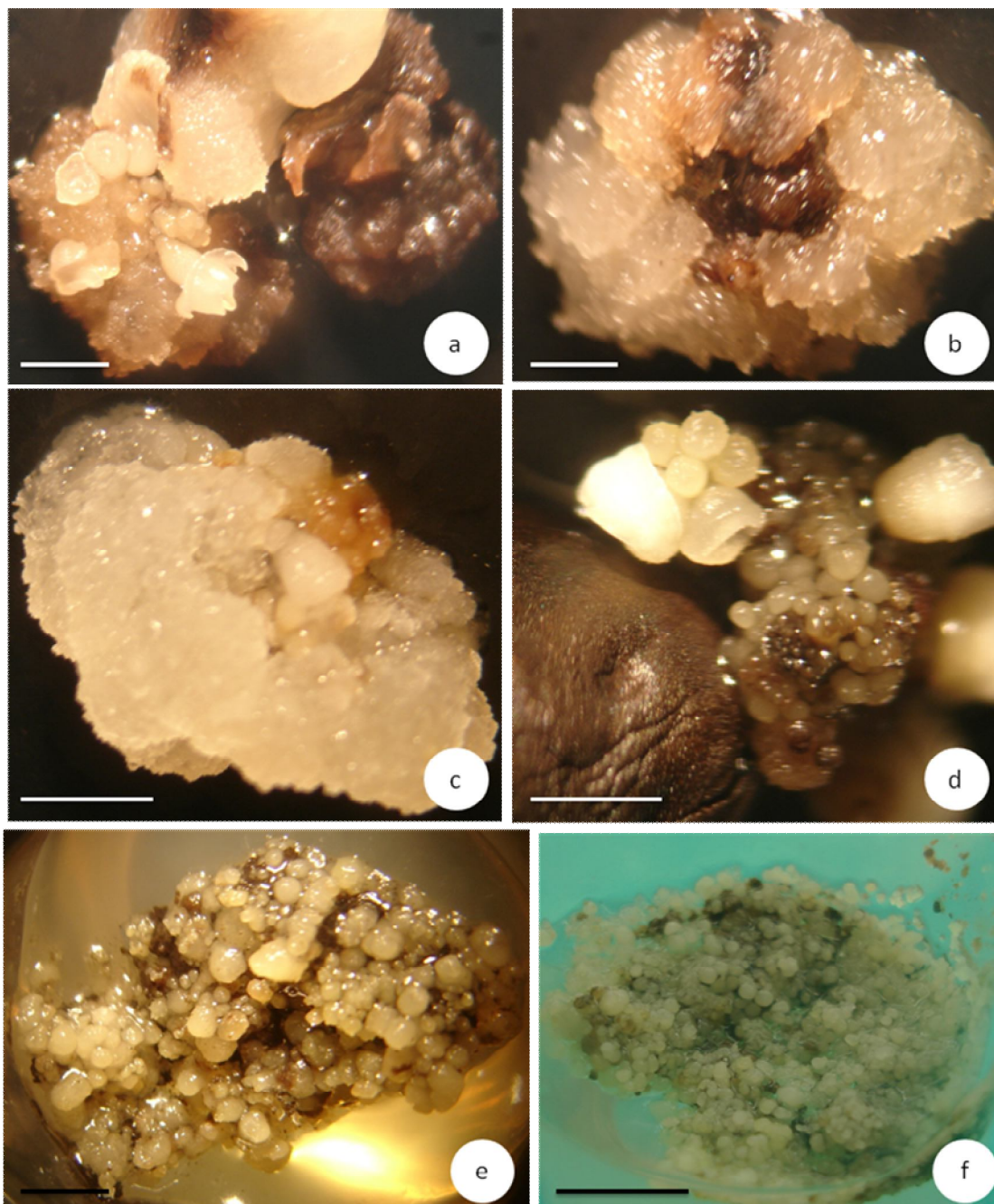


Figura 3 - a) Embriões somáticos obtidos a partir de eixo embrionário zigótico imaturo em meio de cultura WPM acrescido de 200 μM de 2,4-D. Barra: 1,6 mm. b) Calo branco amarelado formado em meio de cultura WPM acrescido de 200 μM de ANA. Barra: 1,4 mm. c) Massa embriogênica contendo embriões somáticos (globular) formados em meio de cultura WPM com 400 μM de picloram. Barra: 2,4 mm. d) Embriões somáticos obtidos a partir de eixo embrionário zigótico imaturo em meio WPM, 400 μM de 2,4-D e 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada. Barra: 2,1 mm. e) Embriões globulares formados em meio WPM e de 1 g L^{-1} de caseína hidrolisada. Barra: 1,1 mm. f) embriões globulares formados em meio de cultura WPM acrescido de 0,5 μM de ANA e 10 μM de BAP. Barra: 2,4 mm.

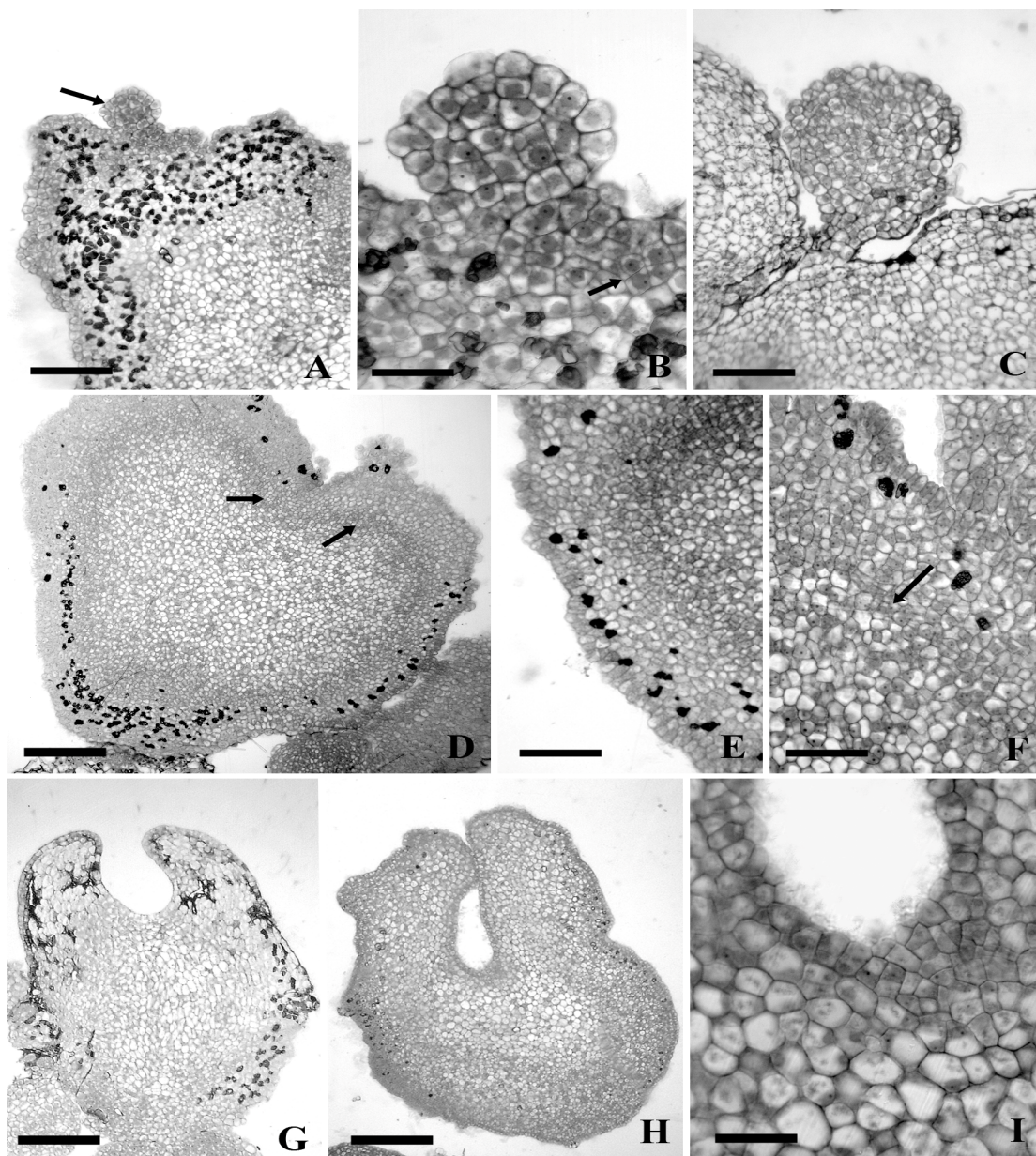


Figura 4 - Estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *Ocotea porosa*. a) Secção longitudinal do pró-embrião (seta). Barra: 150 μm . b) Secção longitudinal com células isodiamétricas com núcleo grande, nucléolo proeminente e divisão anticlinal e periclinal (seta). Barra: 30 μm . c) Embrião somático globular. Barra: 100 μm . d) secção longitudinal do embrião cordiforme, com início da formação do pró-câmbio (seta). Barra: 65 μm . e) Detalhe da epiderme definida no embrião somático cordiforme. Barra: 50 μm . f) Detalhe do início da formação do procâmbio do embrião cordiforme (seta). Barra: 40 μm . g-h) Secção longitudinal do embrião somático cotiledonar, barra: 100 μm . i) Divisão anticlinal e periclinal e organização do meristema apical. Barra: 20 μm .

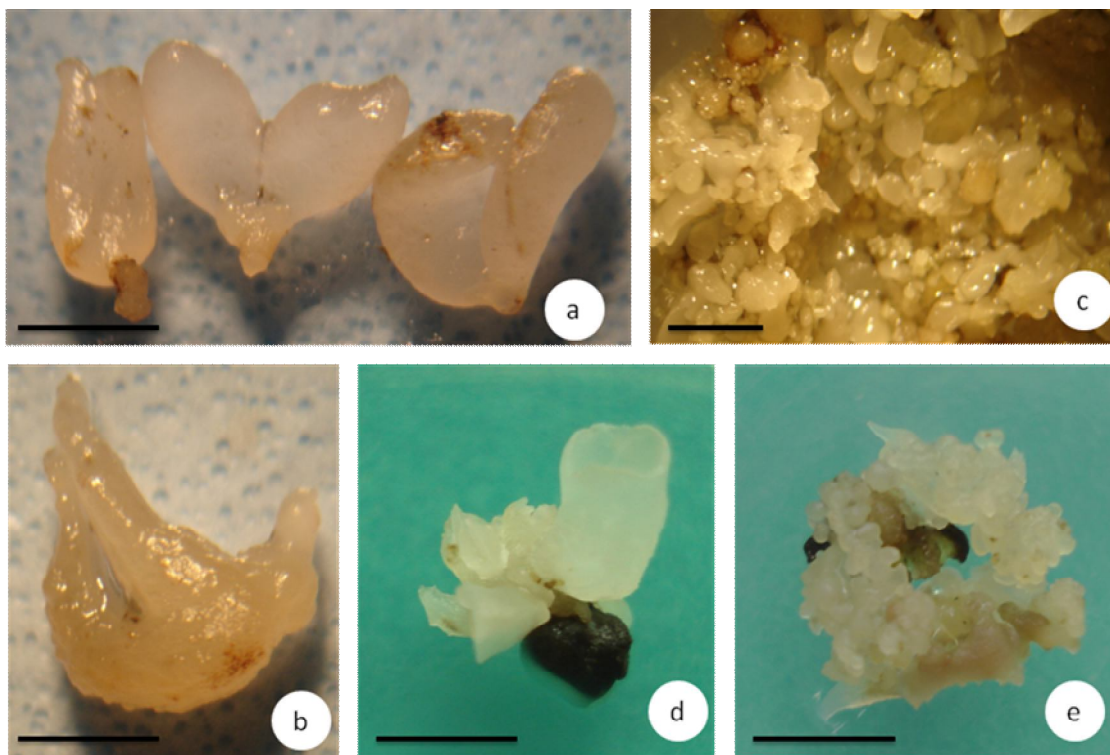


Figura 5 - a-b) Embriões somáticos formados em meio WPM contendo 7% de PEG 6000. Barra: 1,3 mm, 3,4 mm. c) Embriões somáticos formados em meio WPM acrescido de 7% PEG 6000 e 6% de maltose. Barra: 2,0 mm. d) Embrião somático torpedo formado em meio de cultura de conversão contendo $0,58 \mu\text{M}$ de GA_3 e $1 \mu\text{M}$ de BAP. Barra: 4,0 mm. e) Embriões somáticos globulares formados em meio de cultura de conversão contendo $0,54 \mu\text{M}$ de ANA e $10 \mu\text{M}$ de putrescina. Barra: 1,8 mm.

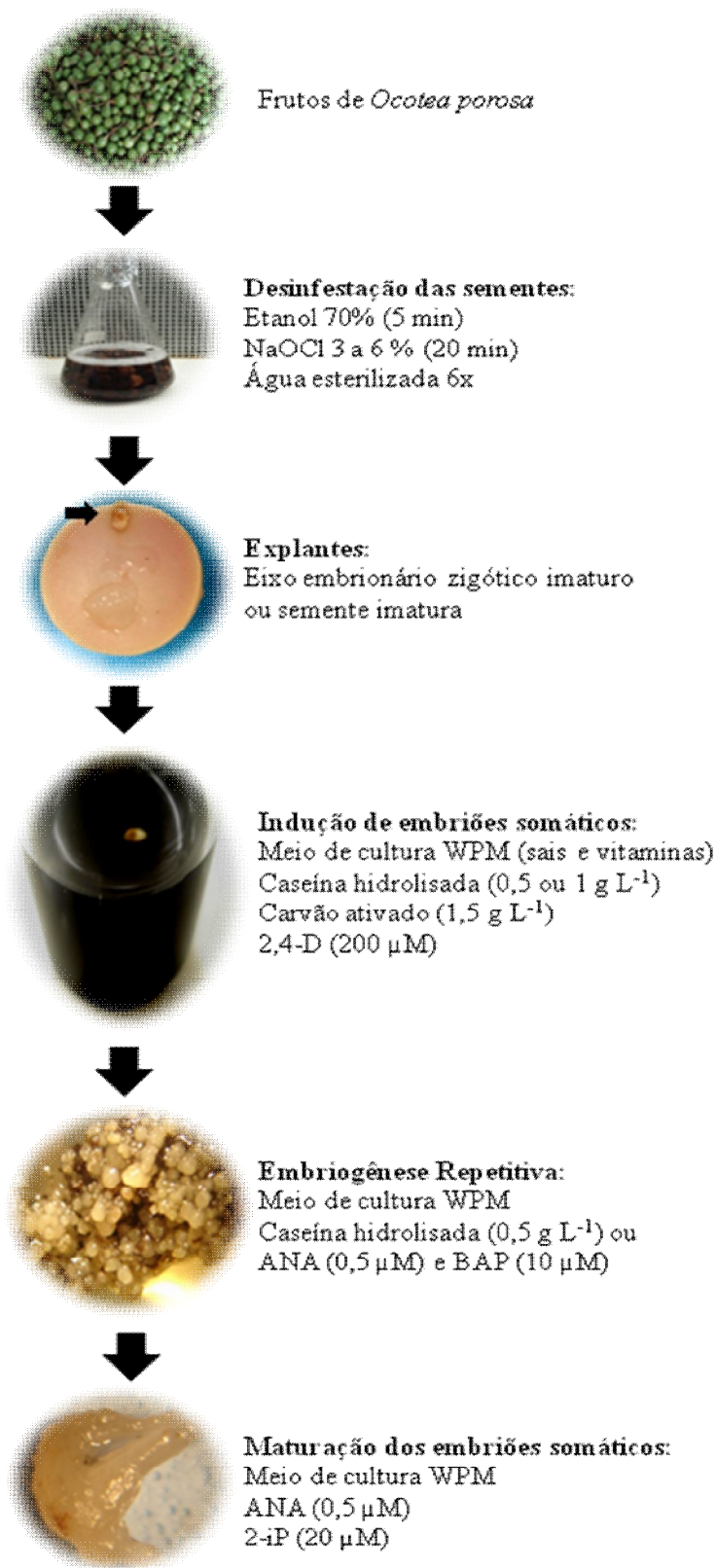


Figura 6 - Representação esquemática do protocolo de regeneração de *Ocotea porosa* a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos como fonte de explantes.

ANEXOS

Anexo 1 - Análise de variância do efeito do NaClO na desinfestação de inflorescências de *Ocotea porosa*, após 30 dias.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
		Sobrevivência	CF	CB
Tratamentos	2	422,2 ^{ns}	600,0 ^{ns}	22,2 ^{ns}
Erro	15	288,8	306,6	17,5
Total	17			

CF: Contaminação fúngica; CB: contaminação bacteriana.

^{ns}: Não significativo.

Anexo 2 - Análise de variância do efeito de diferentes agentes na desinfestação de inflorescências de *Ocotea porosa*, após 30 dias.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
		Sobrevivência	CF	CB
Tratamentos	3	2458,3 [*]	2458,3 [*]	31,7 ^{ns}
Erro	16	250,0	112,5	30,2
Total	19			

CF: Contaminação fúngica; CB: contaminação bacteriana.

^{ns}: Não significativo.

^{*} significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Anexo 3 - Análise de variância do efeito do tipo de explante e dos agentes geleificantes utilizados para induzir a formação de calo branco amarelado em *Ocotea porosa*, após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM, adicionado de ANA (21,5 µM) e BAP (4,44 µM).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Agentes geleificantes	1	2625,0 [*]
Tipos de explante	2	586,6 ^{ns}
Agentes geleificantes x Tipos de explante	2	517,9 ^{ns}
Erro experimental	18	
Total	23	

^{ns}: Não significativo.

^{*} significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Anexo 4 - Análise de variância do efeito do tipo de explante e dos agentes geleificantes utilizados para induzir a formação de calos escuros em *Ocotea porosa*, após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM, adicionado de ANA (21,5 μM) e BAP (4,44 μM).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Agentes geleificantes	1	4499,0*
Tipos de explante	2	1544,2*
Agentes geleificantes x Tipos de explante	2	170,7 ^{ns}
Erro experimental	18	
Total	23	

^{ns}: Não significativo.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Anexo 5 - Análise de variância do efeito do 2,4-D e ANA combinados com 4,44 μM de BAP e 0,2 g L⁻¹ de caseína hidrolisada na indução de calos a partir de discos foliares basais de *Ocotea porosa*, após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM solidificado com ágar (3,5 g L⁻¹).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
		CBA	CE	SR
Tratamentos	4	136,3*	3289,9*	4675,1*
Erro	20	37,0	397,1	413,1
Total	24			

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); SR: explantes sem respostas.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Anexo 6 - Análise de variância do efeito do 2,4-D e ANA combinados com 4,44 μM de BAP e 0,2 g L⁻¹ de caseína hidrolisada na indução de calos a partir de discos foliares basais de *Ocotea porosa*, após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM solidificado com ágar (3,5 g L⁻¹).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio			
		CBA	CE	NE	SR
Tratamentos	4	1125,0*	1702,0*	719,5*	2136,4*
Erro	20	217,4	297,5	94,5	57,1
Total	24				

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NE: necrose; SR: sem respostas.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Anexo 7 - Análise de variância na indução de culturas embriogênicas a partir de eixos embrionários zigóticos maduros em meio de cultura MS, contendo sacarose (20 g L^{-1}), carvão ativado ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), ágar (4 g L^{-1}) e diferentes concentrações de 2,4-D, após 90 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
		CBA	CE	NEEZ
Tratamentos	3	783,4 *	316,5 ^{ns}	112,3 ^{ns}
Erro	16	118,2	324,3	404,7
Total	19			

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^{ns}: Não significativo.

Anexo 8 - Análise de variância na indução de culturas embriogênicas a partir de eixos embrionários zigóticos maduros em meio de cultura WPM, contendo sacarose (20 g L^{-1}), carvão ativado ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), ágar (4 g L^{-1}) e diferentes concentrações de 2,4-D, após 90 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
		CBA	CE	NEEZ
Tratamentos	3	318,4 *	1987,4 *	2662,2 *
Erro	16	66,6	245,8	296,9
Total	19			

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Anexo 9 - Análise de variância do efeito da combinação de auxina (2,4-D) e caseína hidrolisada (CH) na indução de embriões somáticos de *Ocotea porosa*, a partir de eixos embrionários zigóticos maduros cultivados em meio de cultura MS, após 120 dias.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
		CBA	CE	NEEZ
Tratamentos	3	747,7 *	472,2 ^{ns}	358,5 *
Erro	16	200,5	256,0	60,9
Total	19			

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^{ns}: Não significativo.

Anexo 10 - Análise de variância do efeito da combinação de auxina (2,4-D) e caseína hidrolisada (CH) na indução de embriões somáticos de *Ocotea porosa*, a partir de eixos embrionários zigóticos maduros cultivados em meio de cultura WPM, após 120 dias.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
		CBA	CE	NEEZ
Tratamentos	3	1149,3 *	523,4 ^{ns}	1545,8 *
Erro	16	236,4	339,9	71,6
Total	19			

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^{ns}: Não significativo.

Anexo 11 - Análise de variância do efeito da caseína hidrolisada (CH), glutamina (GLN) e prolina (PRO) associadas com 200 μM de 2,4-D, na indução de embriões somáticos de *Ocotea porosa* a partir de eixos embrionários zigóticos maduros em meio de cultura WPM, após 90 dias.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
		CBA	CE	NEEZ
Tratamentos	9	599,3 *	880,3 *	1980,8 *
Erro	30	48,3	309,7	264,7
Total	39			

CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Anexo 12 - Análise de variância do efeito da caseína hidrolisada (CH) e da glutamina (GLN) nos eixos embrionários zigóticos imaturos de *Ocotea porosa* cultivados em meio de cultura WPM suplementado com sacarose (20 g L⁻¹), carvão ativado (1, 5 g L⁻¹), ágar (4 g L⁻¹) e 2,4-D (200 μM), após 90 dias.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		MFES	CMF	CBA	CE	NEEZ
Tratamentos	4	17,2 ^{ns}	498,7 *	20,0 ^{ns}	700,6 ^{ns}	2924,3 *
Erro	15	10,8	87,8	11,5	284,4	587,0
Total	19					

MFES: massa friável contendo embriões somáticos; CMF: calo com massa friável; CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^{ns}: Não significativo.

Anexo 13 - Análise de variância do efeito da combinação de auxina (2,4-D) e caseína hidrolisada (CH) na indução de embriões somáticos de *Ocotea porosa*, a partir de sementes inteiras, após 60 dias.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio			
		NES	MEES	CBA	NEEZ
Tratamentos	3	20,8 *	236,2 *	25,3 ^{ns}	425,9 ^{ns}
Erro	20	2,6	52,8	82,0	511,4
Total	23				

NES: número médio de embriões somáticos globulares; MEES: massa friável contendo embriões somáticos; CBA: calo branco amarelado; NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^{ns}: Não significativo.

Anexo 14 - Análise de variância do efeito da combinação de auxina (2,4-D) e caseína hidrolisada (CH) na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários imaturos de *Ocotea porosa*, após 90 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		NES	MEES	CBA	CE	NEEZ
Tratamentos	3	387,0 *	10,2 *	717,4 *	692,2 ^{ns}	89,9 ^{ns}
Erro	12	4,66	1,04	117,5	427,0	108,2
Total	15					

NES: número médio de embriões somáticos globulares; MEES: massa friável contendo embriões somáticos; CBA: calo com massa friável; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^{ns}: Não significativo.

Anexo 15 - Análise de variância do efeito de diferentes auxinas na indução de embriões somáticos a partir de eixos embrionários imaturos de *Ocotea porosa*, após 120 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		NES	MEES	CBA	CE	NEEZ
Tratamentos	5	13,5 *	51,4 *	1620,7 *	1478,7 *	104,4 *
Erro	18	1,33	4,04	322,2	265,9	5,90
Total	23					

NES: número médio de embriões somáticos globulares; MEES: massa embriogênica contendo embriões somáticos; CBA: calo branco amarelado; CE: calo escuro (preto ou marrom); NEEZ: necrose dos eixos embrionários zigóticos.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^{ns}: Não significativo.

Anexo 16 - Análise de variância da embriogênese somática repetitiva a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos de *Ocotea porosa* após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	
		ME	ESG
Tratamentos	2	308,3 ^{ns}	1132,9 ^{ns}
Erro	9	97,2	272,8
Total	11		

ME: porcentagem de massa embriogênica; NES: número médio de embriões somáticos globulares.

^{ns}: Não significativo.

Anexo 17 - Análise de variância da embriogênese somática repetitiva a partir de eixos embrionários zigóticos imaturos de *Ocotea porosa* durante três subcultivos em meio de cultura WPM suplementado com 0,5 μ M de ANA combinado com BAP.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	
		ME	ESG
Tratamentos	2	100,0 ^{ns}	703,0 ^{ns}
Erro	9	88,8	211,0
Total	11		

ME: porcentagem de massa embriogênica; NES: número médio de embriões somáticos globulares.

^{ns}: Não significativo.

Anexo 18 - Análise de variância do efeito do 2-iP combinado com ANA (0,5 μ M) na maturação de embriões somáticos de *Ocotea porosa* após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio			
		ME	ESG	ESC	EST
Tratamentos	2	58,3 ^{ns}	50,6 ^{ns}	5,6 [*]	3,3 [*]
Erro	9	263,8	195,1	0,5	0,4
Total	11				

ME: porcentagem de massa embriogênica; ESG: número médio de embriões somáticos globulares; ESC: número médio de embriões somáticos cordiformes; EST: número médio de embriões somáticos torpedos.

^{*} Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^{ns}: Não significativo.

Anexo 19 - Análise de variância do efeito do PEG 6000 na maturação de embriões somáticos de *Ocotea porosa* após 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio				
		ME	ESG	ESC	EST	ESCOT
Tratamentos	2	237,0 ^{ns}	148,4 ^{ns}	2,33 [*]	4,0 [*]	5,33 [*]
Erro	9	65,8	162,8	0,2	0,09	0,2
Total	11					

ME: porcentagem de massa embriogênica; ESG: número médio de embriões somáticos globulares; ESC: número médio de embriões somáticos cordiformes; EST: número médio de embriões somáticos torpedos; ESCOT: número médio de embriões somáticos cotiledonares.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^{ns}: Não significativo.

Anexo 20 - Análise de variância do efeito da sacarose e maltose na maturação de embriões somáticos de *Ocotea porosa* após 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM com 7% de PEG 6000.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio			
		ME	ESG	ESC	ESCOT
Tratamentos	3	29,0 ^{ns}	252,6 ^{ns}	1,68 ^{ns}	1,6 [*]
Erro	12	53,9	124,8	1,3	0,2
Total	15				

ME: porcentagem de massa embriogênica; ESG: número médio de embriões somáticos globulares; ESC: número médio de embriões somáticos cordiformes; ESCOT: número médio de embriões somáticos cotiledonares.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^{ns}: Não significativo.