

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

**Avaliação da calogênese em explantes juvenis de teca (*Tectona grandis* L. f) visando a indução da embriogênese somática**

**Renato da Silva Barbosa**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em Silvicultura e Manejo Florestal

**Piracicaba  
2014**

**Renato da Silva Barbosa  
Engenheiro Florestal**

**Avaliação da calogênese em explantes juvenis de teca (*Tectona grandis* L. f)  
visando a indução da embriogênese somática**

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências, Programa: Recursos  
Florestais. Opção em Silvicultura e Manejo Florestal

**Piracicaba  
2014**

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

Barbosa, Renato da Silva

Avaliação da calogênese em explantes juvenis de teca (*Tectona grandis* L. f) visando a indução da embriogênese somática / Renato da Silva Barbosa. - - Piracicaba, 2014.  
97 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. *Tectona grandis* L.f 2. Calos 3. Indução 4. Embriogênese somática I. Título

CDD 634.97338  
B238a

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

*Aos meus pais, Hélio e Maria Helena, que fizeram de mim um homem cheio de sonhos e me ensinaram o caminho para concretizá-los, **Dedico.***

*Ao meu irmão, Fernando, sempre amigo e companheiro,  
o meu exemplo, **Ofereço.***



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me dar a vida, e nela colocar pessoas tão queridas.

Ao orientador Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves, pela parceria nas pesquisas desde a graduação, pelos ensinamentos acadêmicos e amizade ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida, pela coorientação durante a pesquisa, pelos conselhos e ajuda, além da disponibilização do laboratório.

À tia Cris, por todas as dicas, pela convivência todos os dias no laboratório, pelos momentos de desabafo, uma segunda mãe.

Aos amigos da graduação que sempre me apoiaram e me ajudaram nas tomadas de decisões. Bruno, Camila, Daniel, Laura, Lucas e Renata, vocês são especiais.

Às novas amigadas conquistadas durante a pós graduação. Eveline, Gabi e Rafa, vocês fizeram os meus dias mais leves e alegres.

Ao técnico do laboratório de fisiologia das árvores, José Roberto, obrigado pelo apoio e prontidão.

Aos amigos da pequena Cajuru. Marília, Mari, Lígia, Ju, sempre presentes mesmo distantes.

Aos meus familiares, que mesmo desconhecendo o mundo acadêmico sempre me apoiaram.

Aos demais companheiros do laboratório, Naná, Germana, Leandro, Fabi, Érika, Kathy, Raquel, Matheus, Renan, Aline, Marília, Javier, Lara e Ariane, estar

com vocês é sempre muito bom, além de muita experiência trocada sempre há espaço para boas risadas.

À secretária do Programa de Recursos Florestais da ESALQ/USP, Giovana Oliveira, pela paciência e eficiência.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ao Departamento de Ciências Florestais, e ao Programa de Recursos Florestais, pela oportunidade e espaço cedido.

À empresa Floresteca S/A, em nome de Wirifran, pelo fornecimento das sementes de *Tectona grandis* L.f. para realização da pesquisa, sem elas o trabalho não teria sido realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante 24 meses para execução e redação do trabalho.

"A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós."

Marcel Proust

"A esperança não murcha, ela não cansa,  
Também como ela não sucumbe a Crença,  
Vão-se sonhos nas asas da Descrença,  
Voltam sonhos nas asas da Esperança."

Augusto dos Anjos





## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	15
LISTA DE TABELAS .....	19
1 INTRODUÇÃO .....	21
1.1 Objetivo Geral .....	25
1.2 Objetivos específicos .....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	27
2.1 Teca ( <i>Tectona grandis</i> L.f.) .....	27
2.2 Embriogênese somática e indução de calos .....	31
2.3 Pulse com TDZ.....	33
2.4 Maturação de embriões: zeatina e glutamina.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Local de realização dos experimentos .....	39
3.2 Material Vegetal .....	39
3.3 Desinfestação, inoculação e obtenção dos explantes .....	39
3.4 Indução de calos .....	41
3.5 Controle da rizogênese .....	42
3.6 Manutenção dos calos.....	44
3.7 Pulse em TDZ .....	45
3.8 Indução e maturação com zeatina .....	46
3.9 Indução e maturação com glutamina .....	49
3.10 Análises histológica e histoquímica.....	51
3.11 Análise dos dados .....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 Indução de calos .....	55
4.2 Controle da rizogênese .....	59
4.3 Manutenção dos calos.....	61
4.4 Pulse em TDZ .....	67
4.5 Indução e maturação com zeatina .....	71
4.6 Indução e maturação com glutamina .....	75
4.7 Morte celular programada .....	78
4.9 Considerações finais .....	80
5 CONCLUSÕES .....	83
REFERÊNCIAS.....	85



## RESUMO

### **Avaliação da calogênese em explantes juvenis de teca (*Tectona grandis* L. f) visando a indução da embriogênese somática**

A teca (*Tectona grandis* L. f) é uma espécie lenhosa originária da Ásia que possui grande interesse econômico devidos as características nobres de sua madeira. Muito usada para construção de embarcações e móveis de luxo para exposição em ambientes abertos, seu consumo tem aumentado a cada ano, principalmente nos países produtores. Com a pressão das políticas ambientais sobre o uso da madeira de espécies nativas, a teca se mostra uma ótima alternativa para o mercado de madeira serrada. Contudo, a produção comercial desta espécie encontra algumas barreiras, sendo a principal delas, a propagação de matrizes adultas cujas características se adequam ao manejo silvicultural. Para possibilitar a reprodução fiel das árvores selecionadas e, para se realizar o rejuvenescimento do material adulto procedente dessas matrizes, faz-se uso de algumas técnicas, sendo uma delas, o uso da cultura de tecidos. Uma maneira bastante considerada no processo de rejuvenescimento e obtenção de mudas de espécies agrícolas e florestais é a formulação de protocolos de embriogênese somática. 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 estágios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão de gametas. Para tanto, o desenvolvimento de um protocolo eficiente de tal técnica exige muitos estudos preliminares. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo estudar a calogênese em diferentes explantes de teca, através de uma sequência de indução utilizando diferentes fitorreguladores visando a obtenção de embriões somáticos. Para avaliar a resposta dos calos a cada etapa da indução foram realizadas análises histológica e histoquímica dos tecidos. Como respostas foram encontrados os balanços auxina/citocinina mais adequado para produção de calos, sendo eles 1,5/1,0 e, 1,5/4,0mgL<sup>-1</sup> de picloram e BAP respectivamente. Verificou-se que o pulso com TDZ foi responsivo na obtenção de massas pró-embriogênicas, e que o uso da zeatina e da glutamina, não favorecem a maturação de tais estruturas, além de ocasionarem a morte celular programada das células da massa calosa. Contudo, os resultados mostram-se positivos e auxiliam na formulação de novos tratamentos e técnicas de indução da embriogênese somática para a espécie estudada.

Palavras-chave: *Tectona grandis* L.f; Calos; Indução; Embriogênese somática



## ABSTRACT

### **Evaluation of callus induction in juvenile explants of teak (*Tectona grandis* L. f) attempting to induce somatic embryogenesis**

Teak (*Tectona grandis* L. f) is a native woody species from Asia that has great economic interest due the noble characteristics of its wood. Widely used for building ships and luxury furniture for display outdoors, their consumption has increased every year, especially in producing countries. With the pressure of environmental policies on the use of native species of wood, teak shown a great alternative to the market for lumber. However, commercial production of this species has some barriers, the main one, being the propagation of mature breeders whose characteristics are suited to forestry management. In order to enable the faithful reproduction of the selected trees, and to perform the rejuvenation of these matrices derived of adult material, some techniques can be used, one of them is the use of tissue culture. Considered in a way quite rejuvenating and seedlings of agricultural and forest species process is the formulation of somatic embryogenesis protocols. Somatic embryogenesis can be described as the process by which somatic cells develop structures similar to zygotic embryos, through an ordered sequence of characteristic embryogenic stages without occurrence of the fusion of gametes. Thus, the development of an efficient protocol for this technique requires a lot of preliminary studies. Thus, the present work aimed to study the callus induction in different explants of teak, through a sequence induction using different growth regulators in order to obtain somatic embryos. To assess the response of each stage during callus induction, histological and histochemical tissue analysis were performed. Responses as the most suitable for callus production auxin / cytokinin balance sheets were found, they 1.5 / 1.0 and 1.5 / 4,0mgL<sup>-1</sup> picloram/BAP, respectively. It was found that TDZ pulse was responsive to obtain pro-embryogenic masses, and that the use of zeatin and glutamine, are not conducive to maturation of such structures, and enacting the programmed cell death of the cell calli mass. However, the results show up positive and assist in the formulation of new treatments and techniques for induction of somatic embryogenesis of this species.

Keywords: *Tectona grandis* L.f; Callus; Induction; Somatic embryogenesis



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Os dez países com maior área plantada de teca (1000ha) (KOLLERT, W.;  
CHERUBINI, L.; 2012).....28
- Figura 2 - Proprietários das florestas de teca (%) por região (KOLLERT, W.;  
CHERUBINI, L.; 2012).....29
- Figura 3 - Plântula obtida após trinta dias da inoculação das sementes para  
germinação, a qual é possível ver as primeiras folhas jovens, o par de  
folhas cotiledonares e a raíz. ....41
- Figura 4 - Obtenção dos explantes a partir de uma planta germinada. A: descarte  
das raízes e da parte aérea já desenvolvida. B: explantes por inteiro ainda  
ligados ao nó cotiledonar. C: retirada do nó cotiledonar e obtenção dos  
explantes. Onde na parte superior da figura está o epicótilo, na central as  
duas folhas cotiledonares e, na inferior o hipocótilo.....41
- Figura 5 - Diagrama representando a forma de montagem do teste de controle da  
rizogênese, onde os quadros apresentados em vermelho representam o  
experimento. Os quadros preenchidos com os códigos T13 e T14 indicam  
os dois melhores tratamentos do experimento anterior (indução de calos).  
Os demais quadros sem marcação mencionam a quantidade de  
calos/explante que cada novo tratamento foi composto. ....43
- Figura 6 - Diagrama representando a fase de manutenção dos calos após o controle  
de rizogênese. Onde os quadros vermelhos representam os tratamentos  
do momento. O número de frascos vão diminuindo a cada fase devido a  
retirada de amostras destrutivas para as análises histológicas e  
histoquímicas. ....44
- Figura 7 - Diagrama representando a fase de indução por "pulse". Os quadros  
destacados em vermelho representam o experimento, onde é possível  
perceber como foi feita a divisão do material em quantidades iguais para  
cada tratamento. ....46
- Figura 8 - Esquema representativo da fase atual de indução dos calos (quadros  
marcados em vermelho). Tendo estabelecido uma quantidade igual de  
explantes para passar por cada fase de indução, neste experimento cada  
quadrado vermelho (menor) era representado por 2 frascos contendo 4  
explantes cada, sendo que um deles foi retirado no fim dos 30 dias como  
amostra destrutiva para as análises histológica e histoquímica. ....48
- Figura 9 - Esquema representativo da última fase de indução da embriogênese  
somática. Os quadros destacados em vermelho representam a fase atual  
de indução. Cada quadro vermelho pequeno representa 1 frasco contendo  
4 explantes, as quais foram usados como amostra destrutiva para análise  
.....50



- Figura 10 - Esquema representativo de todas as fases de indução da embriogênese somática. Tendo um total de 12 sequências de estímulos, sendo que em cada sequência foram testados os três tipos de explantes, epicótilo, cotilédone e hipocótilo ..... 52
- Figura 11 - Resposta do tratamento T13. As figuras A e B representam calos originados do epicótilo em T13, sendo visível a emissão das raízes (seta vermelha). As figuras C e D representam a estrutura dos calos originados de cotilédones, possibilitando verificar a presença de estrutura polarizada e células ricas em amido (seta azul). As figuras E e F representam calo originado do hipocótilo, também fica evidente a presença de raízes (seta vermelha) e células típicas de calos (seta preta)..... 56
- Figura 12 - Respostas do tratamento T14. As figuras A e B são calos originados de epicótilo, tais calos apresentam células típicas de calos e alguns centros polarizados (seta verde). As figuras C e D representam o material originado de cotilédones, sendo visível a presença de estrutura polarizada e células ricas em grãos de amido (seta azul). Originado do hipocótilo, o calo representado pelas figuras E e F apresenta emissão de raízes (seta vermelha), bem como presença de células alongadas e vacuoladas (seta preta) ..... 57
- Figura 13 - As figuras reportam as melhores respostas encontradas durante a fase de controle da rizogênese. Sendo as figuras A-F os resultados obtidos em calos originários de epicótilo em T13, e cultivados em meio de cultivo com adição de BAP. Tais calos apresentam estruturas pró-embriogênicas (setas laranjadas), bem como células típicas (setas pretas). As figuras G-I representam o melhor resultado para calos originados em T14. Originado de cotilédone, e cultivado em meio com adição de BAP durante o controle da rizogênese, é possível visualizar células sub epidérmicas com características meristemáticas (setas roxas), bem como a presença de estruturas pró-embriônicas (seta laranja) ..... 60
- Figura 14 - As figuras A-F representam os resultados obtidos nos calos mantidos em T13 e cultivados em meio para controle da rizogênese isento. As figuras A e B, C e D, apresentam os calos originados de epicótilo e cotilédone respectivamente. Nestas estruturas é possível visualizar a presença de estruturas pró-embriônicas inviáveis (seta laranja), além da presença de células típicas ricas em grãos de amido (seta preta). As figuras E e F são a resposta de calo originado de hipocótilo, e apresentam células típicas (seta preta), além de estrutura similar a meristemóide, com células de núcleo denso e polarizadas (seta azul). . 63
- Figura 15 - As figuras A-F representam os resultados obtidos nos calos mantidos em T13 e cultivados em meio para controle da rizogênese com adição de BAP. As figuras A e B representam calo originado de epicótilo, que apresenta células típicas (seta preta), mas também apresenta estrutura pró-embriônica (seta laranja), embora inviável. As figuras C e D, E e F, são os resultados observados em calos originários de cotilédones e hipocótilo, respectivamente. Tendo como principais características

células de caráter meristemático nas regiões sub-epidérmicas (seta roxa).....64

Figura 16 - O quadro representa os resultados encontrados para os calos mantidos em T14, e cultivados em meio contendo BAP para controle da rizogênese. A e B são as respostas encontradas para calos originados de epicótilo, apresentam algumas divisões assimétricas, porém ainda em estágio pouco avançado (seta laranja), também se inicia o processo de oxidação dos calos, e pode-se verificar a presença de compostos fenólicos (seta amarela). As figuras C e D representa calos originados de cotilédones, com células em sua maioria de característica típica (seta preta), e presença de compostos fenólicos no espaço intercelular (seta amarela). A resposta de calos originados de hipocótilo estão disponíveis em E e F, contudo, apresentam características celulares típicas (seta preta).....65

Figura 17 - As figuras representam os resultados mais expressivos obtidos com o pulse de 24 horas. Sendo todo material responsivo cultivado em meio contendo BAP durante a fase de controle da rizogênese. A e B mostram a resposta de calos provenientes de epicótilo, induzidos em T13, com células em divisão assimétrica e separadas por mucilagem (seta laranja), caracterizadas como estruturas pró-embriogênicas. Assim como observado para calos induzidos em T14 originados de hipocótilo e cotilédone (C e D, I e J, respectivamente). Calos provenientes da indução em hipocótilos em T14 (E e F) ainda visualizou-se estruturas polarizadas com atividade celular (seta azul), indicando similaridade a um meristemóide. Embora os calos apresentassem visualmente sinais de oxidação, não foi detectada a presença de compostos fenólicos .....68

Figura 18 - O pulse de 48 horas apresentou resultado promissor para aqueles calos que não passaram por cultivo em meio acrescido de BAP, como representado pelos calos de epicótilo e hipocótilo induzidos em T13 (A e B, C e D, respectivamente). Estes calos apresentaram células com características pró-embriogênicas (seta laranja), e células próximas as áreas da divisão assimétrica ricas em grãos de amido (seta preta). Em calos provenientes de T14, cuja indução ocorreu em hipocótilos, após o pulse de 48 horas apresentaram estruturas polarizadas, com células ricas em proteínas, caracterizando um meristemóide (I e J) (seta azul). A oxidação aparente nos calos, não foi evidenciada com a presença de compostos fenólicos. Contudo foi possível visualizar a retração da membrana plasmática em algumas células, caracterizando a morte celular programada existente durante a indução da embriogênese somática (seta rosa) .....70

Figura 19 - Respostas para zeatina em meio líquido. Através da observação das figuras é possível perceber que neste momento os calos já pouco respondem aos estímulos dados. As melhores respostas foram encontradas nos calos originados de epicótilos, induzidos em T13, com controle da rizogênese realizado na presença de BAP, passados pelo pulse de 24 horas (A e B) e pelo pulse de 48 horas (C e G). Nestes calos

ainda estavam presentes células com citoplasma denso e característica meristemática (B)(seta roxa), além de apresentar polarização em determinados conjuntos de células (H)(seta azul). A Morte celular programada fica evidente pela retração da membrana plásmática, ocorrida principalmente nos calos originados de cotilédones, em indução no T13, com controle da rizogênese em meio com BAP, e pulse de 24h (D) e 48 horas (N) (seta rosa). Estruturas com divisão assimétrica (seta laranjada) foram encontradas somente em calos originados de hipocótilos, em meio de indução T13 (F) e T14 (L), com controle da rizogênese em meio suplementado com BAP, e tratados com pulse de 24h (F) e 48h (L), ainda nestas estruturas ficou visível a presença de compostos fenólicos (seta amarela). I e J representam o resposta de calos originado de hipocótilo, induzido em T13, com controle da rizogênese em meio com BAP, e pulse de 48horas, porém sem resposta morfogênica. .... 72

Figura 20 - Respostas positivas para o tratamento com zeatina em associação com ANA foram encontradas somente nos calos induzidos em T14. As divisões assimétricas e polarizadas (seta laranjada) foram encontradas somente em calos originados de epicótilo, e induzidos no tratamento T14, passando por pulse de 24 horas (F) ou 48 horas (D). Células dos calos que se encontravam em morte celular programada (seta rosa), representado pela retração da membrana plasmática (B), representam calos originados de hipocótilos e induzidos em T14, e tratados com pulse de 24 horas..... 74

Figura 21 - Figuras representando os resultados obtidos em meio líquido contendo glutamina. os calos provenientes de indução em meio T14, passados por pulse de 48 horas e originários de hipocótilo (E e F) e epicótilo (K e L) ainda apresentavam estruturas pró embriogênicas (seta laranjada) em processo de morte celular (seta rosa), bem como os calos induzidos em T13, com controle da rizogênese em meio acrescido com BAP, passados por pulse de 24 horas (G e H). Os demais calos eram constituídos de células de característica típicas, em processo de morte celular. Como é o caso dos calos originados de cotilédone (A e B) e epicótilo (C e D) induzidos pelo tratamento T14, e passados pelo pulse de 48 horas. Os calos induzidos a partir de explantes de hipocótilo em T13 e T14 passados respectivamente por pulse de 48 horas (I e J) e de 24 horas (M e N) apenas apresentaram morte celular. Bem como os calos originados de cotilédones em T14 e induzidos em pulse de 48 horas (A e B)..... 76

Figura 22 - Explantes mais responsivos para meio sólido contendo glutamina. Ambos são provenientes de calos originários de epicótilo, induzidos com T14, com 24 horas de indução em TDZ (C e D), e em 48 horas (A e B). Ambos apresentam estruturas pró-embriogênicas inviáveis (seta laranjada) devido ao processo de morte celular (seta rosa). .... 77

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Composição do meio de cultura usado na germinação das sementes de teca. Sendo também o meio base para a montagem dos demais experimentos para indução de embriogênese somática.....40
- Tabela 2- Combinação das doses de picloram e BAP originando 25 tratamentos diferentes para identificar o melhor balanço auxina/citocinina na indução de calos nos explantes estudados de teca. ....42



## 1 INTRODUÇÃO

A teca (*Tectona grandis* L.f) é uma das espécies tropicais mais importantes no mercado internacional de madeira de alta qualidade, extraída tanto de florestas naturais quanto plantadas. As florestas de teca ocorrem naturalmente na Índia, Myanmar, Tailândia e Laos, e cobre uma área de aproximadamente 23 milhões de hectares. Além desses locais também está presente em plantios em pelo menos 36 países tropicais cobrindo uma área de 5,7 milhões de hectares (BHAT e MA, 2004).

No Brasil existem diversos plantios, que variam em quantidade e idade, porém o cultivo comercial da espécie tem se destacado especialmente no estado do Mato Grosso (MATRICARDI, 1988). Estudo de Macedo et al. (2005) mostra o potencial da espécie para as regiões do Mato Grosso, e que a sua produtividade é bem superior àquelas observadas em outras regiões de ocorrência natural ou de plantios.

Embora tenha grande visibilidade no mercado, pouco se sabe sobre plantios comerciais provenientes de mudas clonais, pois a propagação de teca ainda é realizada por sementes de fontes não selecionadas, e um problema para o cultivo da espécie no país está na falta de informações sobre a variabilidade genética das sementes disponíveis, bem como a baixa taxa de germinação destas, influenciada por vários fatores como, o pericarpo espesso que limita a entrada de água e oxigênio para a semente, imaturidade fisiológica da semente e, inibidores químicos presentes no pericarpo (GUPTA ET AL., 1980; KUMAR, 1992; KAOSA, SUANGTHO E KJAER, 1998; ENTERS, 2000; GYVES, ROYANI E RUGINI, 2007; ANDRADE, 2010).

Uma alternativa à propagação seminal é a propagação vegetativa, que é de fundamental importância nos programas de melhoramento florestal (GERA, GERA e SINCH, 2000), permitindo a produção massal das árvores selecionadas em tempo e espaço reduzido conservando as características desejáveis. Esta alternativa oferece certas vantagens em relação à propagação tradicional por semente, por exemplo, consegue-se capturar o componente genético total (VIET, 1996). Entretanto, o processo de maturação comum em espécies lenhosas aumenta com o seu desenvolvimento ontogenético e constitui a principal barreira para a propagação vegetativa utilizando matrizes adultas o que reflete na redução do desenvolvimento das raízes, ou até mesmo na perda da capacidade de enraizamento (ANDRADE,

2010; HIGASHI e SILVEIRA, 2002; DAQUINTA et. al., 2002; WENDLING e XAVIER, 2001; GREENWOOD, 1995; BONGA, 1993; HANCKETT, MURRAY e SMITH, 1987).

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

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

A indução da embriogênese somática é uma etapa crucial para o estabelecimento de culturas embriogênicas *in vitro*. O processo de indução depende do genótipo, tipo e estágio de desenvolvimento do explante e, da composição do meio de cultura (LITZ et al., 1998). De acordo com Chalupa (1999), o estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos utilizados como fonte de explante é fundamental para a expressão de seu potencial morfogenético e para o estabelecimento de culturas embriogênicas. Fatores relacionados à condição fisiológica do explante, às características da espécie e condições experimentais, como a composição do meio de cultura e a atmosfera no interior dos frascos durante o cultivo podem ser fundamentais para o estabelecimento da competência e recepção dos sinais para desencadear o processo de diferenciação celular (FURTADO, 2010).

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

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal estudar a calogênese de explantes de teca visando a indução da embriogênese somática.





### **1.1 Objetivo Geral**

Estudo da calogênese em diferentes explantes de teca (*Tectona grandis* L.f) em estado juvenil visando a indução da embriogênese somática.

### **1.2 Objetivos específicos**

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

II - Estudar diferentes sequências de estímulos em calos de teca para a produção de embriões somáticos.

III - Selecionar o tipo de explante mais responsivo para a sequência de estímulo mais adequada.

IV - Realizar análises histológica e histoquímica durante o processo de indução nos calos para verificar o padrão de resposta morfogênica em cada etapa da indução para cada tipo de explante estudado.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Teca (*Tectona grandis* L.f.)

A teca (*Tectona grandis* L.f.), é uma espécie lenhosa nativa da Índia, Tailândia, Laos e Myanmar (KEOGH, 1987; DAQUINTA et al., 2001). Seu crescimento é melhor em clima tropical quente, com estação seca de três a cinco meses, precipitação anual de 1500 a 2000mm e temperaturas entre 22 e 27°C (KEOGH, 1987).

Devido ao avanço do desmatamento, e ao fato de que o mercado madeireiro tem se nutrido de florestas naturais para a obtenção de madeira, nos últimos anos a teca tem se introduzido em vários países (MONTAGNINI, 2004). Abdelnour e Muñoz (2005) notaram o interesse de muitos países por incluí-la nos programas de reflorestamento devido principalmente a alta demanda de sua madeira, seu rápido crescimento e alta qualidade da madeira, além disso, a espécie apresenta resistência à algumas doenças (DAQUINTA et al., 2001).

A madeira de teca tem destinação nobre, como a produção de móveis de luxo, embarcações e decoração (AKRAM e AFTAB, 2009). Seu cultivo é muito difundido nos trópicos, sendo a maioria das florestas plantadas provenientes de mudas seminais (NAUTIYAL et al., 1991).

No Brasil a teca atinge idade de corte com um quarto do tempo (25 anos) quando comparado à sua região de origem. Podendo ser utilizada, de forma direcionada, em suas fases intermediárias de desenvolvimento. O perfil do consumidor dessa madeira geralmente consiste em pessoas com elevado poder aquisitivo, bom nível cultural e que exige produtos de qualidade, além de terem consciência ecológica. A teca é encontrada em domicílios que requerem decoração diferenciada e adaptada a intempéries. Além destes, existe uma grande população nos países asiáticos, culturalmente consumidora de objetos decorativos e peças de usos pessoais confeccionadas com teca. Ainda são encontradas na rede hoteleira e tem grande aceitação no mercado internacional nas camadas mais altas da população.

A produção mundial está 90% concentrada nos países asiáticos e é consumida pelos próprios países produtores. Além do que, nesses países, a idade de corte é a partir dos 80 anos. Face isso, apenas 16% da produção mundial estimada é ofertada no mercado internacional. A oferta da madeira pelos países asiáticos não poderá ser ampliada em função da falta de área para expansão dos

plantios e da competição com outras culturas, principalmente daquelas destinadas a alimentação (KOLLERT, W.; CHERUBINI, L.; 2012).

Somente no Brasil há condições ambientais e econômicas para expansão das florestas de teca em volumes que atenderão a demanda futura por esta madeira. Sendo o Mato Grosso, o estado que possui maior área em condições ideais para esta cultura, com clima e solo adequado para o plantio tornando-se a região de maior potencialidade para implantação com segurança, de florestamento de teca no mundo (KOLLERT, W.; CHERUBINI, L.; 2012).

A espécie representa uma pequena proporção da produção e comércio de madeira mundial. O mercado de toras de teca estimado em relação as madeiras tropicais é inferior a 2%, mas em termos de valor representa muito mais, uma vez que a espécie faz parte do mercado de madeiras de alto valor, sendo este o maior componente da economia florestal de muitos países da região tropical. Florestas plantadas de teca tem atraído grandes investimentos do setor privado na África, Ásia e América Latina. Globalmente, ela constitui o único recurso madeireiro que está em crescimento em área plantada (KOLLERT, W.; CHERUBINI, L.; 2012).

As florestas naturais estão estimadas numa cobertura de 29.039 milhões de hectares na Índia, Laos, Myanmar e Tailândia. Quase metade desse valor está localizado em Myanmar. A área de reflorestamento está distribuída em 38 países, e é estimado em 4.346 milhões de hectares, os quais 83% está na Ásia, 11% na África, e 6% na zona tropical da América (Figura 1).

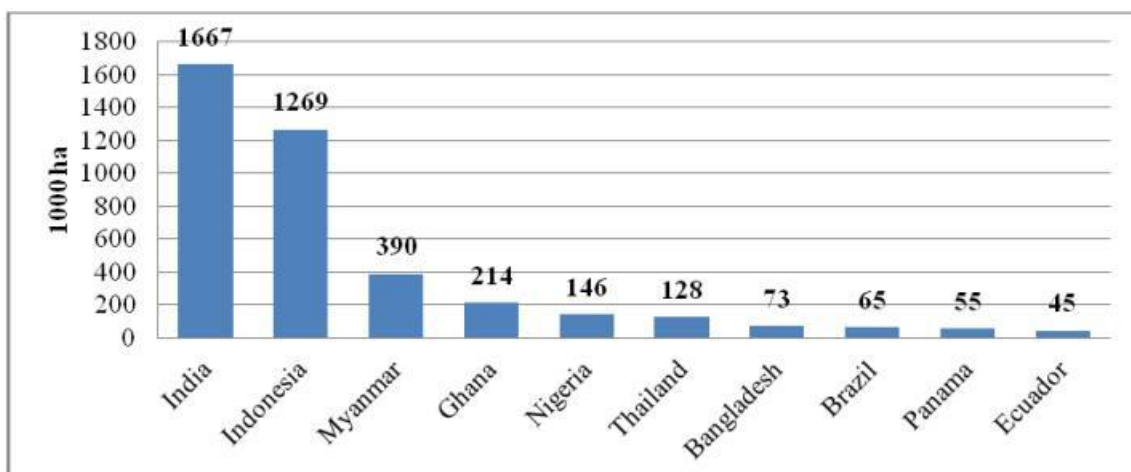


Figura 1 - Os dez países com maior área plantada de teca (1000ha) (KOLLERT, W.; CHERUBINI, L.; 2012)

Os plantios de teca são o único investimento madeireiro (serrada) emergente no mundo. Comparado com pesquisas prévias, a área plantada de teca tem crescido consideravelmente na África, América Central, América do Sul e Ásia.

Na África, Ásia e Caribe a maioria dessas florestas são propriedades do governo, geralmente da administração agrícola ou florestal, mas nas Américas Central e Sul o governo do Estado é proprietário de uma pequena parcela entre 1% a 12% das florestas, enquanto o setor privado detém 88% na América Central, e 99% na América do Sul (Figura 2).

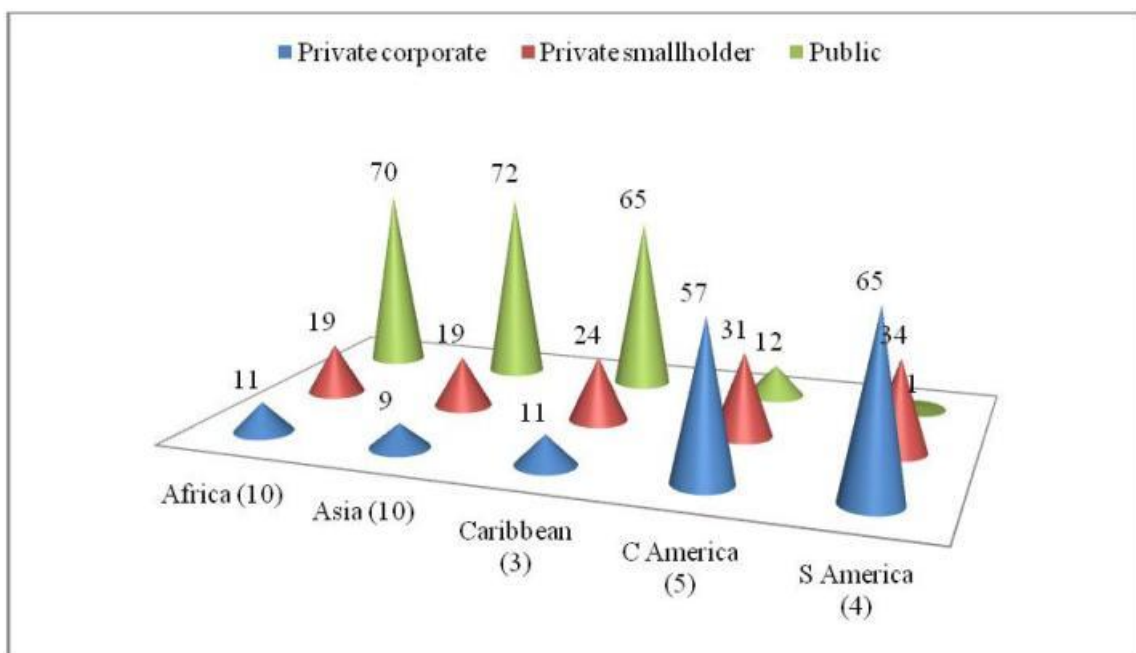


Figura 2 - Proprietários das florestas de teca (%) por região (KOLLERT, W.; CHERUBINI, L.; 2012)

As taxas de crescimento dos plantios de teca são muito discutidos. Muitas previsões de crescimento continuam aparecendo na internet e na literatura, predizendo taxas muito altas de crescimento, cerca de 20m<sup>3</sup>/ha/ano. A performance do crescimento depende da qualidade do material plantado e das melhores práticas de manejo. O incremento médio anual reportado por 26 países aparece muito modesto e mentiroso, entre 2 e 14m<sup>3</sup>/ha/ano, exceto em alguns investimentos de alta intensidade nas Américas Central e Sul (KOLLERT, W.; CHERUBINI, L.; 2012).

Myanmar é o único país que produz tal madeira com qualidade provenientes de plantios naturais, pois Índia, Laos e Tailândia tem feito proibições na retirada de madeira de florestas naturais e até mesmo banido a exportação. No futuro pode ser esperado que a produção sustentável desta madeira das florestas naturais sejam

bastante limitadas devido ao aumento do desmatamento e da competição por serviços ambientais (KOLLERT, W.; CHERUBINI, L.; 2012).

A alta demanda internacional por um uso generalizado da madeira de teca tem acarretado na substituição da madeira das florestas naturais da Ásia, para incluir ao mercado uma matéria-prima proveniente de um plantio de rápido crescimento, de menor diâmetro provenientes da África e da América Latina (KOLLERT, W.; CHERUBINI, L.; 2012).

A propagação da teca no mundo realizou-se por sementes de várias origens e como resultado muitas das plantações resultaram em baixa qualidade. A reprodução sexuada apresenta desvantagens como, por exemplo, a falta de uniformidade nos plantios (causado pela variabilidade genética) e pela baixa taxa de germinação (entre 20 e 25%) devido a dormência do tegumento, na qual há a necessidade de adotar técnicas custosas para a semeadura, além da dependência da disponibilidade de sementes, a qual só acontece nos períodos de frutificação (GYVES et al., 2007; SLATOR et al., 2013).

Esta situação justificou o início dos programas de melhoramento da espécie. Murillo et al. (2001) mencionam que tal situação tem sido mudada através da propagação clonal, tomando esta via de multiplicação muita importância nos programas de melhoramento, já que permite capturar 100% de informação genética contida na árvore superior selecionada, o que resulta em maiores retornos por ganhos em qualidade e uniformidade das plantações (MONTEUUIS et al., 1998).

Baseado na importância econômica da *Tectona grandis*, o desenvolvimento dos estudos em melhoramento de essências florestais através do uso de técnicas de clonagem são necessários para uma produção em grande escala, e alguns modelos similares àqueles desenvolvidos com a cultura de *Eucalyptus* como a miniestaquia, micropropagação e microestaquia (TITON et al., 2003; BRONDANI et al., 2012; RUEDELL et al., 2013) seriam úteis. A viabilidade de produzir essa mudas em uma escala comercial é entretanto dependente de outros aspectos relacionados a juvenildade, a qual é diretamente associada a habilidade de emissão de raízes adventícias. A maturidade vegetal pode ser manipulada usando técnicas apropriadas de clonagem, a qual é capaz de reverter a juvenildade de tecidos, beneficiando grandemente a indução de raízes. A indução do estímulo bioquímico correto em tecidos e órgãos requer um alcance diferenciado de respostas organogênicas, sendo necessário desenvolver protocolos específicos para cada situação.

Dentro das técnicas de propagação clonal, o cultivo de tecidos *in vitro*, ou micropropagação, tem tido um uso limitado em espécies florestais, contudo, tem-se feito esforços importantes para aplicar essas técnicas não só às espécies de interesse comercial com propósitos de produção, mas também com fins para conservação (DAQUINTA et al., 2000). Em teca, alguns trabalhos mostram a possibilidade de propagação sob condições *in vitro*. (ABDELNOUR e MUÑOZ, 2005; DAQUINTA et al., 2002; MONTEUUIS et al., 1998).

Atualmente a propagação *in vitro* está sendo vista como um método alternativo para propagação clonal. A super exploração causou a destruição das florestas naturais de teca, garantindo uma necessidade urgente de desenvolver técnicas alternativas como a cultura de tecidos (GUPTA et al., 1980) para acelerar a produção de propágulos. Devi et al. (1994) tentou melhorar a regeneração e multiplicação de teca com sucesso limitado, enquanto Gangopadhyay et al. (2003) utilizou técnicas da cultura de tecidos para a produção de réplicas fiéis, e estabeleceu regenerantes com fidelidade genética. Entretanto, a micropropagação de árvores maduras tem permanecido problemática. Explantes pobres em respostas e exudatos fenólicos das regiões onde são realizados os cortes são os maiores problemas para o estabelecimento *in vitro* de culturas de *Tectona grandis* (SHIRIN e SARKAR, 2003; SHIRIN et al., 2005).

Em teca, diversos explantes têm sido usados proficientemente para produzir culturas regeneráveis *in vitro*, sendo eles, gemas axilares (KUSHAOKAR e SHARON, 1996; RAMESH et al., 2003), gemas adventícias (CHALUPA, 1987), gemas axilares de segmentos nodais (TIWARI et al., 2002; RAMESH et al., 2003), discos de folhas (RANASINGHE, 1996; MUMINOVA et al., 1999), gemas apicais (KUSHAOKAR e SHARON, 1996) e gemas axilares de segmentos caulinar (NUTIYDAL et al., 1992; RANASINGHE, 1996). A cultura de tecido para micropropagação em teca mostra-se promissora com gemas e segmentos nodais. Entretanto, não há protocolos viáveis disponíveis para propagação *in vitro*.

## **2.2 Embriogênese somática e indução de calos**

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 estágios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão de gametas (GUERRA et al., 1999; JIMENEZ, 2001).



A embriogênese somática é o desenvolvimento de células haplóides ou somáticas, sem a fusão de gametas, em vários estágios embriogênicos, formando uma nova planta (JIMENEZ, 2001). É também o processo na qual as células somáticas estão empenhadas na formação de células totipotentes embriogênicas capazes de se tornarem plantas completas (SUPRASANNA e BAPAT, 2006).

Durante o seu desenvolvimento, embriões somáticos passam por estágios 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).

Na embriogênese somática, existem fases distintas de desenvolvimento, cada a qual é caracterizada por eventos bioquímicos e moleculares distintos (SUPRASANNA e BAPAT, 2006).

As metodologias utilizadas para indução de embriogênese somática envolvem mudanças no meio de cultura, estabelecimento de diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento e outras condições de cultura, como a densidade de células, nutrientes e iluminação. Em relação ao fator regulador de crescimento, as auxinas sintéticas, como o picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), indutoras de embriogênese somática, têm sido investigadas com frequência em espécies agrônômicas. A formação direta de embriões somáticos em *Paspalum scrobiculatum* ocorreu com a utilização de altos níveis de picloram, isoladamente ou em combinação com cinetina (KAUR e KOTHARI, 2004). Picloram também foi efetivo na obtenção de embriões somáticos em *Arachis hypogaea* (LITTLE et al., 2000).

Tecnologicamente, a regeneração de plantas através da embriogênese somática compreende uma sequência de passos que inclui a iniciação de culturas embriogênicas, proliferação, maturação em embriões somáticos e regeneração de plantas. Embora a embriogênese somática tenha sido muito estudada em espécies modelos como *Daucus carota* (RAGHAVAN, 2006) e *Picea abies* (VON ARNOLD et al., 2005), a regeneração de plantas provenientes de culturas embriogênicas é ainda um problema na maioria das angiospermas lenhosas, as quais são fisiologicamente diferentes das espécies modelos mencionadas.

Para *Tectona grandis*, muitos autores têm reportado a necessidade e importância do desenvolvimento de protocolos de micropropagação, pois os processos conhecidos hoje, não são satisfatórios (TAMBARUSSI, 2009).

Baghel et al. (2008) conseguiu obter plantas de teca usando cotilédones, nós cotiledonares e epicótilos, mostrando que estes podem ser usados eficientemente nos protocolos laboratoriais.

A embriogênese somática e as sementes sintéticas são consideradas ferramentas interessantes no desenvolvimento da silvicultura, especialmente para as espécies de maiores demandas, sendo consideradas técnicas práticas e com ganho de tempo (ASMAH et al., 2011).

A multiplicação de *Tectona grandis* via embriogênese somática ou através de tecidos meristemáticos, combinados com a tecnologia de sementes sintéticas (ARA et al., 2000) podem suprir a constante produção clonal em qualquer período do ano. Com os avanços na biotecnologia florestal, novas estratégias para maior qualidade de produção clonal serão desenvolvidas e podem impactar no crescimento da produtividade e rentabilidade da indústria madeireira.

### **2.3 Pulse com TDZ**

O uso de pulse na cultura de tecidos é pouco relatado, principalmente quando o explante não se trata de órgãos embriogênicos, tendo maior uso na indução de rizogênese (FLYGHT, 1993; KOVAC, 1993; SHEKHAWAT, 1998).

Segundo Mathur e Nadgauda (1999) esses tipos de estudos são importantes para a redução do tempo de exposição do regulador de crescimento a cultura, do período de indução e, do custo do material usado no laboratório. Vários são os tipos de pulse usados em experimentos de indução de organogênese, como por exemplo pulso de luz (PINKER, 2000), pulse de pulverização (LINGHT et al., 2002), e pulse de reguladores de crescimento (SRIVASTAVA et al., 2001; VIKRANTI, 2003; BENNET, 2003; ANTHONY et al., 2004; EYMAR, 2000; MATHUR e NADGAUDA, 1999).

O Thiadiazuron (TDZ) foi o primeiro regulador de crescimento reportado por ter atividade como citocinina em 1982 por Mok et al. Ele tem atividade similar a citocininas (MOK et al. 1982; MOK e MOK, 2001) e também induz respostas as auxinas (MURTHY et al., 1995; JONES et al., 2007).

Seu uso aprimorou a propagação *in vitro* de várias espécies, pelo desenvolvimento de gemas adventícias (WILHELM 1999; ALMEIDA et al., 2012.) e pela indução de embriões somáticos (HUTCHINSON et al., 1996; ZHANG et al., 2001; ALMEIDA et al., 2012).

Tem sido mostrado que o TDZ induz uma alta atividade intrínseca de citocininas em bioensaios (MOK et al., 1982). A natureza do TDZ para proliferar e multiplicar as zonas meristemáticas existentes em um tecido e induzir a organogênese foi observado em numerosas espécies de plantas (HUETTEMAN e PREECE, 1993). Existe evidência considerável que TDZ pode estar envolvido no crescimento da biossíntese ou acúmulo de citocininas endógenas do grupo purina (MURTHY et al., 1995; HUTCHINSON et al., 1996). Maxwell et al. (2007) reportou que, a indução de regeneração por TDZ é a manifestação de uma cascata metabólica que inclui um evento sinalizador inicial, acumulação, e transporte de sinais endógenos nas plantas como auxina e melatonina, um sistema de mensageiros secundários, e uma resposta simultânea ao estresse. Pela influência de níveis endógenos de ambas citocininas e auxinas, TDZ induz diferentes respostas morfogênicas em diferentes tecidos.

A influência do TDZ na embriogênese somática em amendoim foi primeiramente reportado por Gill e Saxena (1992). Eles demonstraram a indução de embriões somáticos de explantes de cotilédones e folhas jovens de amendoim.

Saxena et al. (1992) reportou a embriogênese somática em plântulas morfológicamente intactas germinadas em meio suplementado com 10 $\mu$ M de TDZ. Eles observaram que os embriões somáticos foram induzidos na região apical e sobre a superfície dos cotilédones e hipocótilos das plantas germinadas, os quais eventualmente maturavam e se desenvolviam em plantas.

Murthy et al. (1995) avaliaram a rota regulatória de TDZ e tipos de explantes na resposta do potencial da embriogênese somática em relação aos níveis endógenos de hormônios em amendoim. Eles demonstraram que por influenciar níveis endógenos de auxina e citocinina, TDZ induziu embriogênese somática.

Johsi et al. (2008) reportou o aparecimento de estruturas semelhantes a gemas em massas embriogênicas quando estas foram cultivadas em meio contendo combinações de 2,4D e TDZ. Tais estruturas viraram gemas, as quais subsequentemente formaram brotos e plântulas. Eles verificaram que a massa embriogênica se converteu em massa organogênica na presença de TDZ.

Para Drake et al. (1997) o método do pulse na multiplicação vegetativa de *Picea sitchensis* foi mais eficaz que o uso de reguladores de crescimento no meio de cultura durante o período da cultura *in vitro*.

A embriogênese somática também foi induzida através de pulse quando inflorescências de *Liquidambar styraciflua* tiveram como fator de indução pulse de TDZ durante o período de uma semana e posterior cultivo em meio isento de reguladores de crescimento. Com isso ficou mostrado que tecidos maduros desse espécie tem habilidade para produzir culturas embriogênicas quando fornecido o estímulo apropriado (MERKLE et al., 1997).

#### **2.4 Maturação de embriões: zeatina e glutamina**

As primeiras referências sobre embriogênese somática foram de gimnospermas no fim da década de 70 e início da década de 80, com as descrições de estruturas similares a embriões, mas incapazes de se desenvolverem (DURZAN e CHALUPA, 1976) e (DURZAN, 1980). Entretanto, foi passado apenas alguns anos para que embriões somáticos maduros, capazes de se converterem em plântulas, foram gerados a partir de embriões imaturos de *Picea abies* (HAKMAM et al., 1985).

Desde então, muitos estudos têm focado no desenvolvimento de métodos para indução e maturação de embriões somáticos, e os resultados para um vasto número de espécies têm mostrado a possibilidade da regeneração de embriões somáticos em cultura.

Embora a remoção de auxina tem sido relacionado com a promoção do desenvolvimento de embrião somático em muitas angiospermas (THORPE e STASOLLA, 2001), a remoção de auxina e citocinina, juntos com o aumento da osmolaridade no meio são requisitos para produção do estágio cotiledonar em muitas coníferas. A redução dos níveis de auxina e citocinina é comumente o fator de sucesso para se obter embriões somáticos imaturos. Com a retirada, ou troca, das citocininas e auxinas utilizadas para a produção de embriões somáticos, algumas outras substâncias são utilizadas para que estas estruturas se desenvolvam em plantas. Alguns casos de sucesso no desenvolvimento de embriões somáticos têm sido relatados com o uso de zeatina (citocinina) e também com o uso de glutamina (aminoácido).

As citocininas são derivadas da adenina (aminopurina) e têm um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies (SANTIAGO, 2001). Induzem a divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea. As citocininas mais usadas em cultura de tecidos são a cinetina (CIN), benziladenina (BAP), zeatina (Zea), isopentenil adenina (2ip) e thidiazuron (TDZ).

Fujimura e Komamine (1979) estabeleceram um sistema de embriogênese somática em cultura de cenoura em suspensão. O método consistia em selecionar aglomerados de células por centrifugação e cultivá-los em meio de cultura contendo zeatina e isento de qualquer auxina. Nesse sistema, mais de 90% dos aglomerados de diferenciaram em embriões.

Outros trabalhos também obtiveram o mesmo sucesso quanto ao uso da zeatina. Na presença de zeatina sem a adição de auxina, Rey et al. (2002) induziram a formação de calos embriogênicos a partir de embriões tratados previamente com colchicina, trifluralina ou oryzalina.

Em rosa híbrida, a combinação de zeatina e 2,4D também possibilitou a formação de embriões somáticos (BURRELL et al., 2006). Já em *Quercus suber*, a adição de 9 a 11M de zeatina e 4,5 a 11M de 2,4D possibilitaram a formação de embriões somáticos a partir de folhas de plantas de 60 anos de idade (PINTO et al., 2002).

A glutamina é uma fonte de nitrogênio orgânico comumente utilizada em meios de cultura de tecido de plantas superiores (FRANKLIN e DIXON, 1994), sendo que vários pesquisadores demonstraram o envolvimento benéfico da suplementação do meio de cultura com esse aminoácido. Entretanto, poucas são as hipóteses acerca do modo de ação desse aminoácido.

Altas concentrações de glutamina no meio de cultura aumentaram a proliferação de tecidos embriogênicos de *Cryptomeria japonica*, sugerindo-se que o tratamento com glutamina teria aumentado a síntese de macromoléculas ou metabólitos essenciais à manutenção de competência das células à embriogênese (OGITA et al., 2001). O conteúdo endógeno de glutamina aumentou rapidamente durante os primeiros estágios de iniciação de gemas adventícias em segmentos caulinares de *Torenia*, pois o acúmulo desse aminoácido nas células deve ser um dos fatores necessários para a iniciação de gemas adventícias (TANIMOTO e HARADA, 1989).

Hamasaki et al. (2005) observaram que o período de indução da organogênese de bases foliares de abacaxizeiro ocorreu entre o primeiro e sétimo dia de cultivo *in vitro* no meio de cultura suplementado com glutamina. Nesse período, as células competentes da base foliar responderam aos sinais gerados pela adição do aminoácido no meio de cultura.

Price e Smith (1979) trabalhando com *G. klotzschianum*, comprovaram a formação de embriões somáticos a partir de suspensões celulares depois de três a quatro semanas em meio que continha glutamina, entretanto, não conseguiram regenerar plantas, embora vários autores tenham observado o desenvolvimento de embriões somáticos e a regeneração de plântulas a partir de suspensões celulares da cultivar Cocker, utilizando glutamina no meio (FINER, 1988; KUO et al., 1989).



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de realização dos experimentos**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fisiologia das Árvores, no Departamento de Recursos Florestais, e no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, ambos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), no município de Piracicaba, São Paulo.

#### **3.2 Material Vegetal**

O material vegetal utilizado no trabalho foram explantes, hipocótilo, cotilédone e epicótilo, provenientes de mudas seminais germinadas *in vitro*. As sementes eram de matrizes de *Tectona grandis* L.f., e foram doadas pela empresa Floresteca S/A. Tais matrizes já se encontram em estágio adulto (14 anos de idade) e estão plantadas no município de Jangada, Mato Grosso.

#### **3.3 Desinfestação, inoculação e obtenção dos explantes**

Após a retirada das sementes de forma mecânica dos, as mesmas necessitaram passar por um processo de desinfestação, de modo diminuir a taxa de contaminação por micro-organismos exógenos no ambiente *in vitro*. A assepsia das sementes foi realizada da seguinte maneira: fez-se primeiro uma lavagem com solução de álcool 70% durante dois minutos, seguido de um enxague com água autoclavada, em sequência, as sementes foram lavadas durante dez minutos em solução comercial de hipoclorito de sódio com 2,0 a 2,5% de cloro ativo. Após essas três etapas, ainda em solução de hipoclorito de sódio, as sementes foram colocadas na câmara de fluxo laminar, onde para finalizar o processo foram enxaguadas três vezes com água autoclavada, ou até que o cheiro do hipoclorito desaparecesse.

Seguido da desinfestação as sementes foram inoculadas em meio de cultura determinado em pré teste para germinação (Tabela 1). Além dos sais e vitaminas, foi acrescido ao meio de cultura  $30\text{gL}^{-1}$  de sacarose, o pH foi ajustado a 5,8, e usado  $4\text{gL}^{-1}$  de ágar para obtenção do meio semi sólido. O meio de cultura foi vertido em frascos de vidro, cada frasco foi completado com 25ml de meio de cultura e autoclavado a  $121^{\circ}\text{C}$ ,  $1,0\text{Kgfc}m^{-2}$  durante 20 minutos. As sementes foram inoculadas de modo deixar o embrião com a radícula em contato com meio de cultura. Foram inoculadas 7 sementes por frasco.



Tabela 1 - Composição do meio de cultura usado na germinação das sementes de teca. Sendo também o meio base para a montagem dos demais experimentos para indução de embriogênese somática

Meio de cultura para germinação		
Classificação	Substância	Dose (mg L <sup>-1</sup> )
Macronutrientes	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	537,00
	KNO <sub>3</sub>	1900,00
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	408,00
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440,00
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	555,00
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80
	Na <sub>2</sub> EDTA	37,20
Micronutrientes	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,90
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,25
	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,25
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,10
Vitaminas	Ácido Nicotínico	0,50
	Piridoxina	0,50
	Tiamina	5,00
	Meso Inositol	100,00
	Pantotenato de Cálcio	2,40

Após inoculação das sementes, estas ficaram em sala de crescimento à temperatura de 26°C +- 2, fotoperíodo de 16/8 horas e iluminância de 4000 lux fornecida por lâmpadas brancas, localizadas a 30 cm da prateleira, durante 30 dias, tempo este suficiente para germinação, quando após este período era possível visualizar nas plântulas: folhas cotiledonares, o primeiro par de folhas, e a raiz em desenvolvimento (Figura 3).



Figura 3 - Plântula obtida após trinta dias da inoculação das sementes para germinação, a qual é possível ver as primeiras folhas jovens, o par de folhas cotiledonares e a raiz

Após a germinação das plântulas foram, então, obtidos os explantes para dar início ao experimento de indução de calos. Sendo tais explantes: epicótilo, hipocótilo, e folhas cotiledonares (Figura 4).

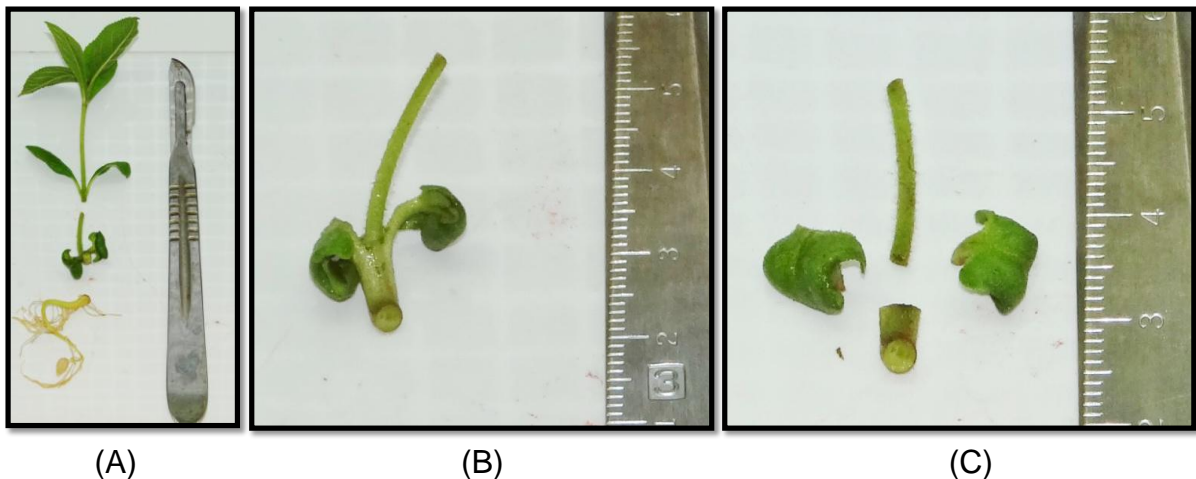


Figura 4 - Obtenção dos explantes a partir de uma planta germinada. A: descarte das raízes e da parte aérea já desenvolvida. B: explantes por inteiro ainda ligados ao nó cotiledonar. C: retirada do nó cotiledonar e obtenção dos explantes. Onde na parte superior da figura está o epicótilo, na central as duas folhas cotiledonares e, na inferior o hipocótilo

### 3.4 Indução de calos

O experimento consistiu em encontrar o melhor balanço auxina/citocinina para indução de calos para cada um dos explantes testados. Como citocinina foi

usado o BAP (6- benzilaminopurina), e como auxina foi usado o picloram. Foram testados 25 balanços diferentes, sendo cinco concentrações diferentes de cada um dos fitorreguladores (Tabela 2).

Tabela 2- Combinação das doses de picloram e BAP originando 25 tratamentos diferentes para identificar o melhor balanço auxina/citocinina na indução de calos nos explantes estudados de teca

Doses picloram / BAP	BAP (mg L <sup>-1</sup> )					
	0,0	0,5	1,0	4,0	8,0	
picloram (mg L <sup>-1</sup> )	0,0	0,0/0,0 (T1)	0,0/0,5 (T2)	0,0/1,0 (T3)	0,0/4,0 (T4)	0,0/8,0 (T5)
	0,5	0,5/0,0 (T6)	0,5/0,5 (T7)	0,5/1,0 (T8)	0,5/4,0 (T9)	0,5/8,0 (T10)
	1,5	1,5/0,0 (T11)	1,5/0,5 (T12)	1,5/1,0 (T13)	1,5/4,0 (T14)	1,5/8,0 (T15)
	5,0	5,0/0,0 (T16)	5,0/0,5 (T17)	5,0/1,0 (T18)	5,0/4,0 (T19)	5,0/8,0 (T20)
	10,0	10,0/0,0 (T21)	10,0/0,5 (T22)	10,0/1,0 (T23)	10,0/4,0 (T24)	10,0/8,0 (T25)

O meio de cultura utilizado foi o meio base usado na germinação das sementes acrescido das combinações de reguladores dando um total de 25 tratamentos. O meio de cultura foi vertido em tubos de ensaio, cada tubo levou uma quantidade de 10ml de meio. Cada tratamento teve um total de 12 repetições para cada explante (epicótilo, cotilédone e hipocótilo). Cada repetição era composta por 4 tubos de ensaio, e cada tubo de ensaio tinha inoculado um explante.

A indução dos calos teve uma duração de 60 dias, sendo realizada uma transferência de meio de cultura após os primeiros 30 dias. Durante todo esse período o material foi cultivado em sala de crescimento, porém na ausência de luz.

No final deste período foram selecionados os dois melhores tratamentos para se dar continuidade no processo de indução da embriogênese somática. Sendo eles T13 e T14. Tal seleção foi realizada de acordo com a porcentagem de calos formados por explante em cada tratamento e, ausência de manifestação bacteriana. Para investigar o potencial morfogênico dos calos obtidos nos dois tratamentos foram feitas análises histológica e histoquímica.

### 3.5 Controle da rizogênese

Após o período de indução de calos e, selecionados os dois melhores tratamentos, foi necessário realizar um experimento para controle da rizogênese nos

explantes. Este experimento consistiu em testar meios com uma dose baixa de citocinina, ou isento de fitorreguladores. Os meios de cultura utilizados foram: o meio base do processo de germinação ausente de reguladores (como no processo de germinação), e meio base adicionado de  $1,0\text{mgL}^{-1}$  de BAP. Desta forma, os calos dos tratamentos responsivos foram divididos pela metade. Uma metade cultivada em meio isento e outra em meio com BAP. O meio de cultura depois de autoclavado foi vertido em frascos, contendo 25ml de meio por frasco. Para cada tipo de explante dentro de cada tratamento (T13 e T14) foram utilizados 11 frascos, contendo 4 calos por frasco (Figura 5).

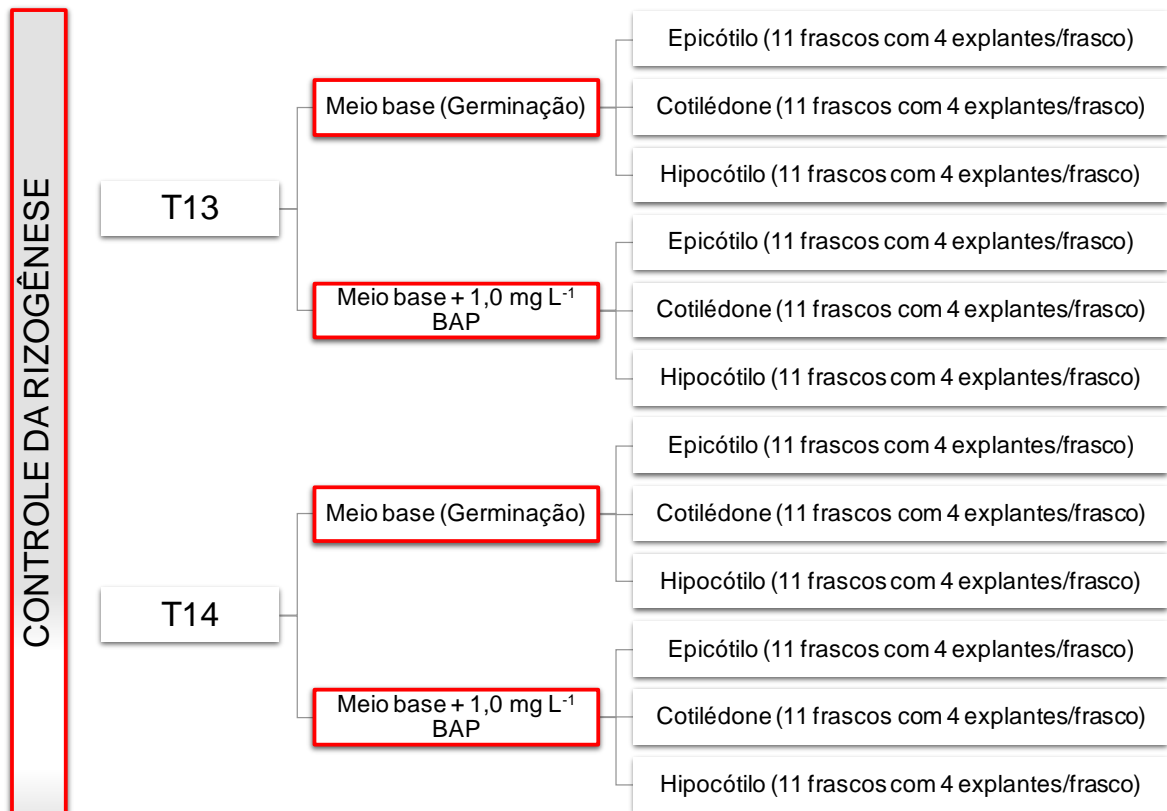


Figura 5 - Diagrama representando a forma de montagem do teste de controle da rizogênese, onde os quadros apresentados em vermelho representam o experimento. Os quadros preenchidos com os códigos T13 e T14 indicam os dois melhores tratamentos do experimento anterior (indução de calos). Os demais quadros sem marcação mencionam a quantidade de calos/explante que cada novo tratamento foi composto

Este experimento também foi conduzido como a germinação, em sala de crescimento em presença de luz. Todo o processo levou 60 dias, sendo que após os 30 primeiros dias foi realizada uma transferência de meio de cultura. Para avaliação do controle da rizogênese foram realizadas análises histológica e histoquímica.

### 3.6 Manutenção dos calos

Realizado o controle da rizogênese, os calos de maneira geral pararam de se desenvolver, logo não foi possível ver qualquer avanço na indução da embriogênese somática. Para tanto, foi necessário realizar o processo de manutenção dos calos, de forma que estes voltassem a ter respostas morfogênicas que resultasse na produção de embriões. A fase de manutenção foi realizada de maneira simples. Aqueles calos provenientes do tratamento 13, voltaram para meio de cultura com o balanço auxina/citocinina original, assim como os calos provenientes do tratamento 14 (Figura 6).

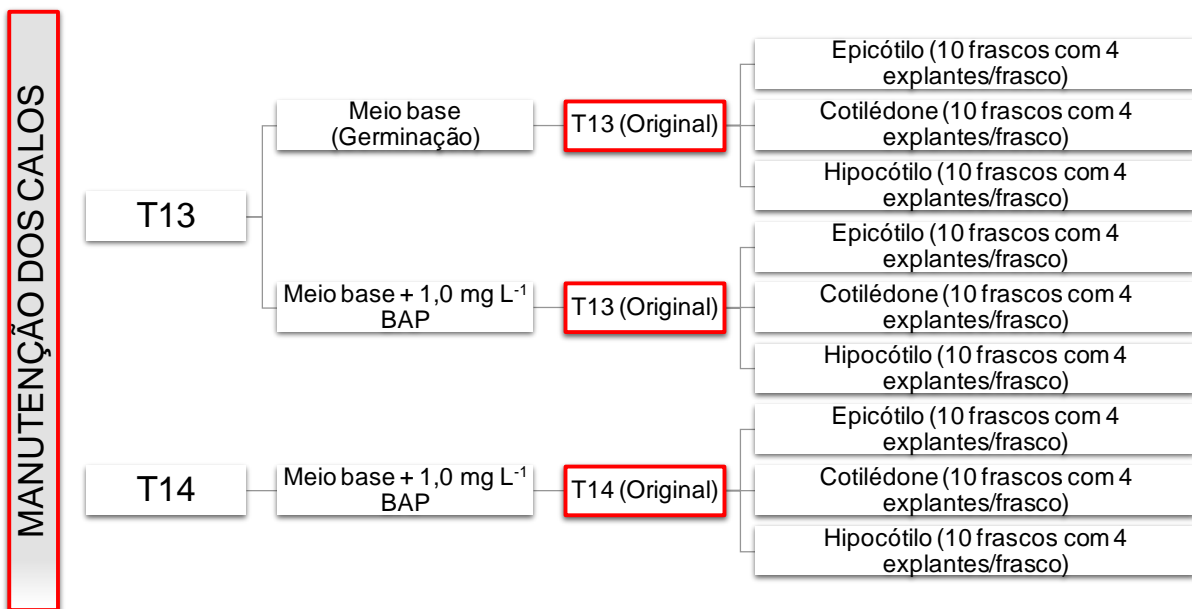


Figura 6 - Diagrama representando a fase de manutenção dos calos após o controle de rizogênese. Onde os quadros vermelhos representam os tratamentos do momento. O número de frascos vão diminuindo a cada fase devido a retirada de amostras destrutivas para as análises histológicas e histoquímicas

O meio de cultura foi autoclavado e vertido em frascos, cada frasco com uma quantidade de 25ml de meio de cultura. O cultivo de manutenção teve duração de 30 dias e foi conduzido em sala de crescimento com as mesmas características da etapa de germinação. Já no início da fase de manutenção o material proveniente do tratamento 14 foi reduzido à metade, pois durante o controle da rizogênese,

aqueles calos tratados em meio isento de fitorreguladores apresentaram alta manifestação bacteriana endofítica, sendo então, descartados.

Também no final do período foram feitas análises histológica do material, bem como a histoquímica, investigando principalmente a presença de embriões ou zonas meristemáticas, além do controle da rizogênese.

### **3.7 Pulse em TDZ**

Seguido da fase de manutenção dos calos, foi realizado experimento com pulse de TDZ na intenção de proliferar zonas meristemáticas e também induzir a embriogênese somática. Foi feita solução de TDZ a  $0,02\text{mgL}^{-1}$  em água destilada. Ainda na solução (a cada litro) foram acrescentadas 3 gotas de Tween 20 (detergente) para quebrar a tensão superficial da água e auxiliar a absorção do fitorregulador pelo material vegetal. Depois de autoclavada a solução foi vertida em frascos de vidro, tendo um volume de 25ml de solução por frasco. Foram então estabelecidos dois tempos de ação para o pulse, um de 24 horas e outro de 48 horas (Figura 7).

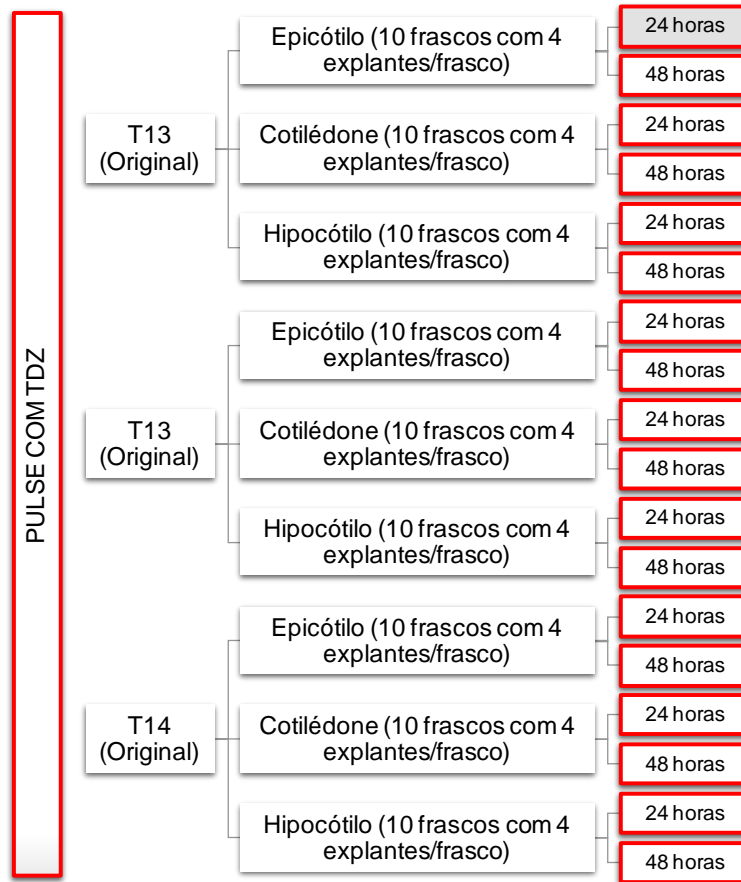


Figura 7 - Diagrama representando a fase de indução por "pulse". Os quadros destacados em vermelho representam o experimento, onde é possível perceber como foi feita a divisão do material em quantidades iguais para cada tratamento

Após o tempo de imersão no pulse o material foi transferido para meio de cultura isento, com a mesma formulação daquele usado na fase de germinação das sementes. Neste meio, os calos ficaram durante um período de 30 dias em sala de crescimento em presença de luz (assim como na germinação). Para avaliar a resposta do pulse, foram coletadas amostras de todos os tratamentos e foram feitas análises histológica e histoquímica.

### 3.8 Indução e maturação com zeatina

Após os calos passarem pelo pulse foi testada a indução e maturação de possíveis estruturas pró-embrionárias através do uso de zeatina, e zeatina em combinação com ANA.

Nesse caso foram testados estímulos de duas maneiras. Na primeira situação, o meio utilizado foi o meio base (germinação) acrescido de  $0,2\text{mgL}^{-1}$  de

zeatina, sem a adição de ágar, utilizando-se o meio líquido. Após autoclavado o meio foi vertido em frascos de vidro, com um volume de 25ml de meio, onde então foram inoculados metade dos calos provenientes de cada um dos tratamentos até a fase do pulse (Figura 8). Após a transferência do material os fracos foram fixados em um agitador elíptico com rotação de 20rpm, com uma alternância de rotação de 15 minutos, isto é, 15 minutos ligado e, 15 desligado. Este teste permaneceu em sala de crescimento com as características citadas no tópico 3.3 por um período de 30 dias.

Na segunda situação também foi utilizado meio base (germinação), porém acrescido de  $0,2\text{mgL}^{-1}$  de zeatina em conjunto com  $0,4\text{mgL}^{-1}$  de ANA. O meio utilizado foi o semi-sólido, com presença de agente geleificante (ágar). Depois de autoclavado o meio de cultura foi dispensado em frascos de vidro também contendo um volume de 25ml de meio. A outra metade dos calos provenientes da sequência de estímulos foram inoculados, e após transferência o material permaneceu em sala de crescimento com as características descritas no tópico 3.3. por um período de 30 dias.

No final dos 30 dias foram coletadas amostras e feitas análises histológica e histoquímica do material.



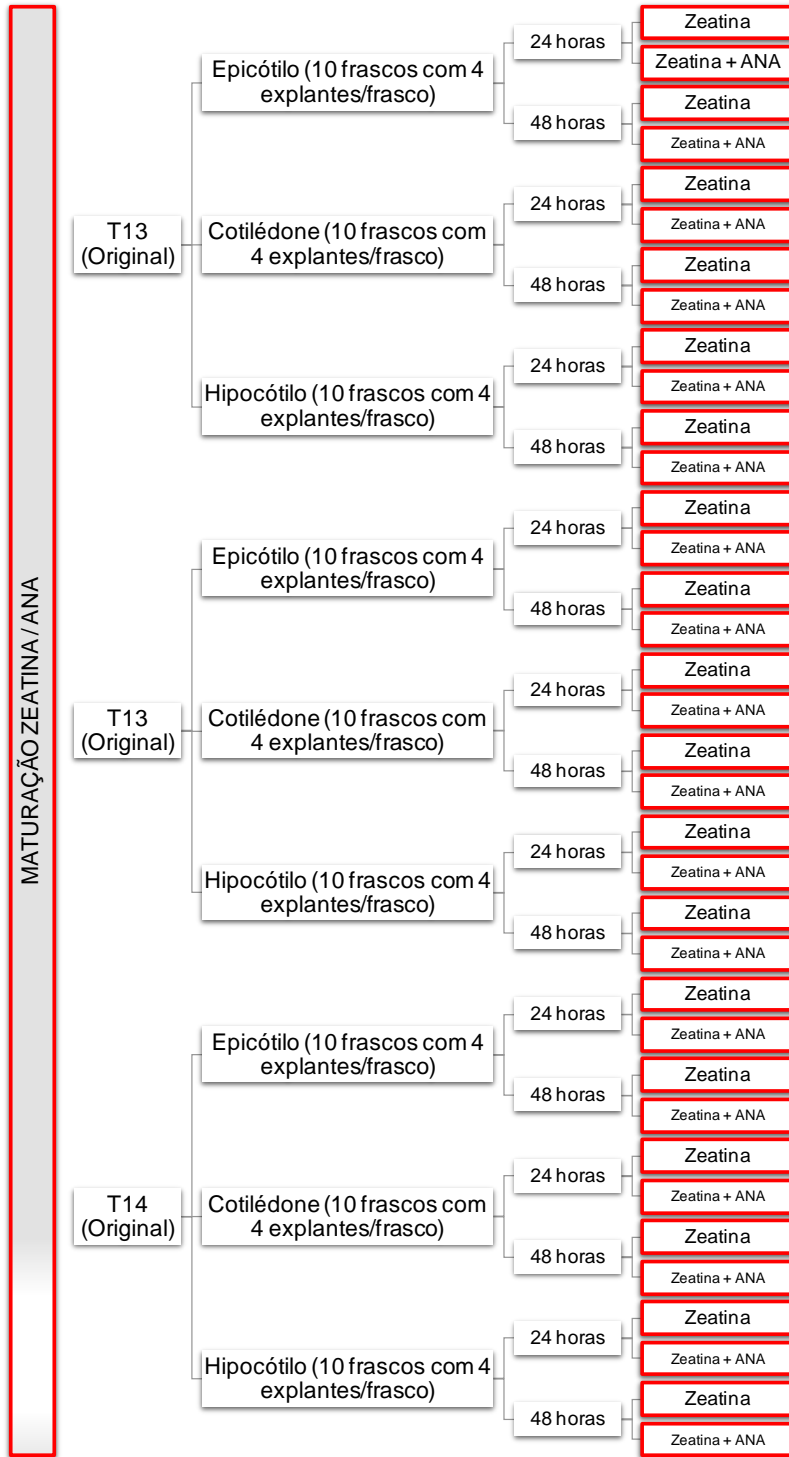


Figura 8 - Esquema representativo da fase atual de indução dos calos (quadros marcados em vermelho). Tendo estabelecido uma quantidade igual de explantes para passar por cada fase de indução, neste experimento cada quadrado vermelho (menor) era representado por 2 frascos contendo 4 explantes cada, sendo que um deles foi retirado no fim dos 30 dias como amostra destrutiva para as análises histológica e histoquímica

### 3.9 Indução e maturação com glutamina

A última indução testada durante todo o processo para obtenção de embriões somáticos foi o uso de glutamina. Neste caso o objetivo foi estudar a ação da glutamina nos calos em meios de cultura com texturas diferentes e, na ausência de luz. Os calos que já estavam meio líquido no teste anterior (tópico 3.8) foram inoculados em meio base (germinação) acrescido de  $100\mu\text{ML}^{-1}$  de glutamina. O meio foi autoclavado e só não apresentava agente geleificante (sem ágar), isto é, o material que anteriormente estava em meio líquido continuou em meio com tal textura. O meio foi vertido em frascos de vidro contendo um volume de 25ml de meio por frasco. Após transferência dos calos para meio com glutamina, os frascos foram fixados em um agitador elíptico com rotação de 20rpm, com uma alternância de rotação de 15 minutos, ou seja, 15 minutos ligado e, 15 desligado. Este teste permaneceu em sala de crescimento com as características citadas no tópico 3.3 por um período de 30 dias, porém na ausência de luz.

Já o material que anteriormente tinha sido cultivado em meio semi-sólido foram transferidos para meio base, idêntico ao meio de germinação, contudo acrescido de  $100\mu\text{ML}^{-1}$  de glutamina. Depois de autoclavado o meio foi vertido em frascos de vidro, contendo 25ml de meio por frasco. Assim como citado no parágrafo acima, os calos que estavam em meio semi-sólido durante o teste com zeatina+ANA, permaneceram em meio semi sólido na presença de glutamina (Figura 9). Depois de transferidos para novo meio o material permaneceu em sala de crescimento com as características descritas no tópico 3.3. por um período de 30 dias, porém sem a presença de luz.

Passados os 30 dias o material restante foi avaliado através de análises de histológicas e histoquímica.

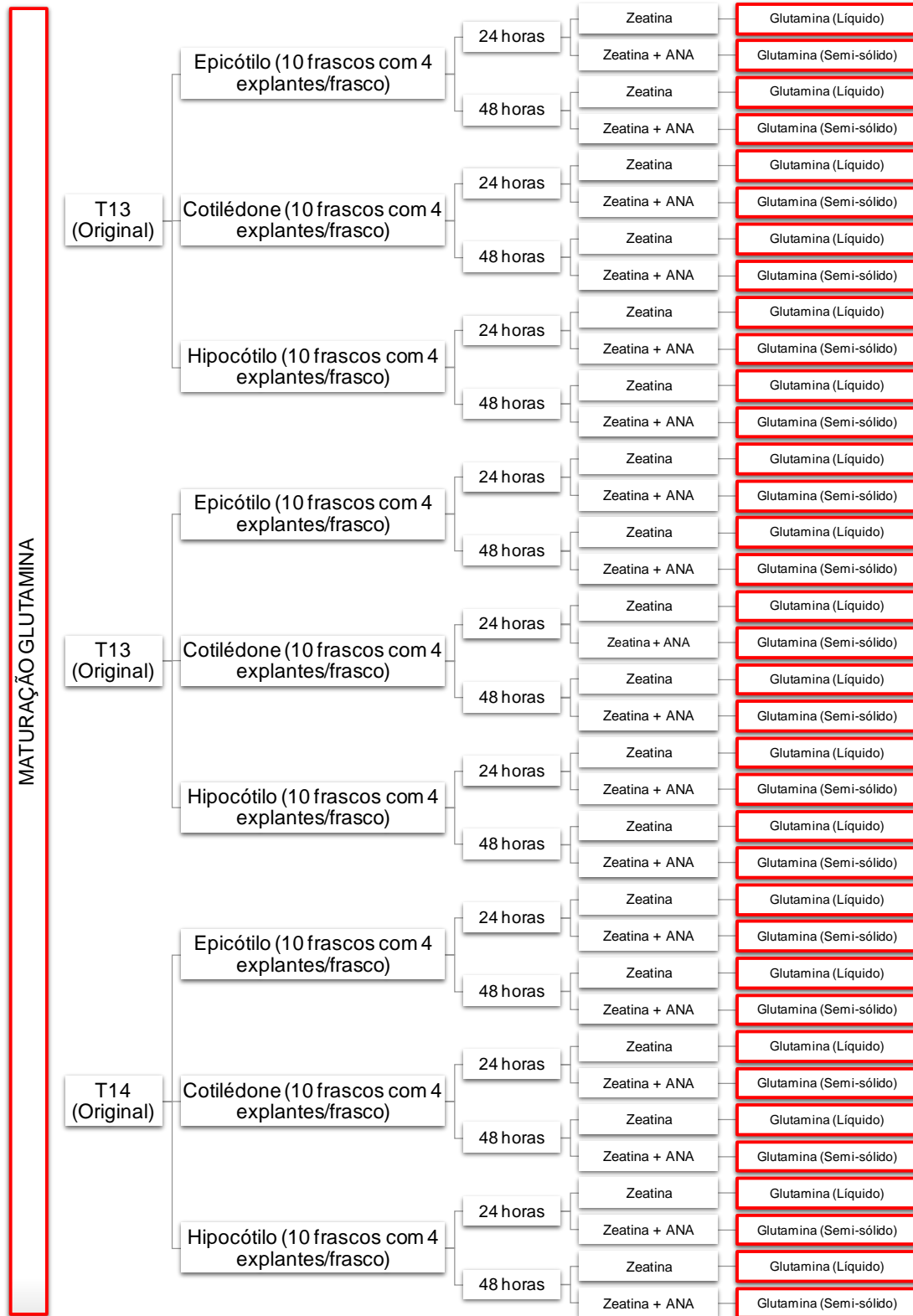


Figura 9 - Esquema representativo da última fase de indução da embriogênese somática. Os quadros destacados em vermelho representam a fase atual de indução. Cada quadro vermelho pequeno representa 1 frasco contendo 4 explantes, as quais foram usados como amostra destrutiva para análise

### 3.10 Análises histológica e histoquímica

Para as análises histológica e histoquímica foram coletados no final de cada fase de indução material representativo de cada explante original para cada sequência de estímulos testados. No primeiro teste, indução de calos, foram coletados 4 calos de cada tipo de explante (12 calos) para cada um dos tratamentos mais responsivos, T13 e T14, totalizando um total de 24 calos. A partir dos ensaios de controle da rizogênese, no final de cada fase foi retirado um frasco por tipo de explante original para cada uma das sequências de estímulos, sendo que, cada frasco continha 4 calos (Figura 10).

O material coletado foi fixado em solução Karnovsky (1965) e armazenado sob refrigeração. O processo de fixação foi realizado da seguinte forma: imediatamente depois de coletado, o material era identificado e colocado separadamente em frascos (volume de 10ml) e então cobertos com a solução karnovsky. Já imersos em tal solução era realizado o processo de vácuo para infiltração do produto. Foram realizados 2 vácuos a 600mmHg durante quinze minutos, entre um procedimento e outro os frascos eram batidos de forma a retirar o ar que estava dentro do material vegetal. Após o segundo procedimento, o material foi deixado a vácuo 600mmHg "overnight" (durante uma noite toda). Após a fixação o material foi guardado sob refrigeração.

Seguido do procedimento citado anteriormente (fixação) foi realizado a infiltração de historesina no material. Primeiramente o material fixado é retirado do refrigerador, e é então removido o agente fixador dos frascos. Logo em sequência é iniciada a série de desidratação alcoólica-etílica em concentrações crescentes, sendo elas 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% (v/v). Nesta etapa o material fica em cada um das soluções pelo período de dez minutos, sendo repetida duas vezes a última etapa (100%).

A terceira etapa que tem que se iniciar imediatamente após a desidratação do material é a infiltração. O primeiro passo foi realizar a infiltração da solução A de historesina, no caso foi usado a resina de hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica, Heidelberg, Germany). A infiltração da historesina foi feita em três partes: primeiramente o material foi imerso em uma solução 1:1 (Solução A: Álcool 100%) e passado a vácuo 400mmHg durante cinco minutos, após este processo o material ficou descansando durante duas horas em temperatura ambiente. Na segunda parte

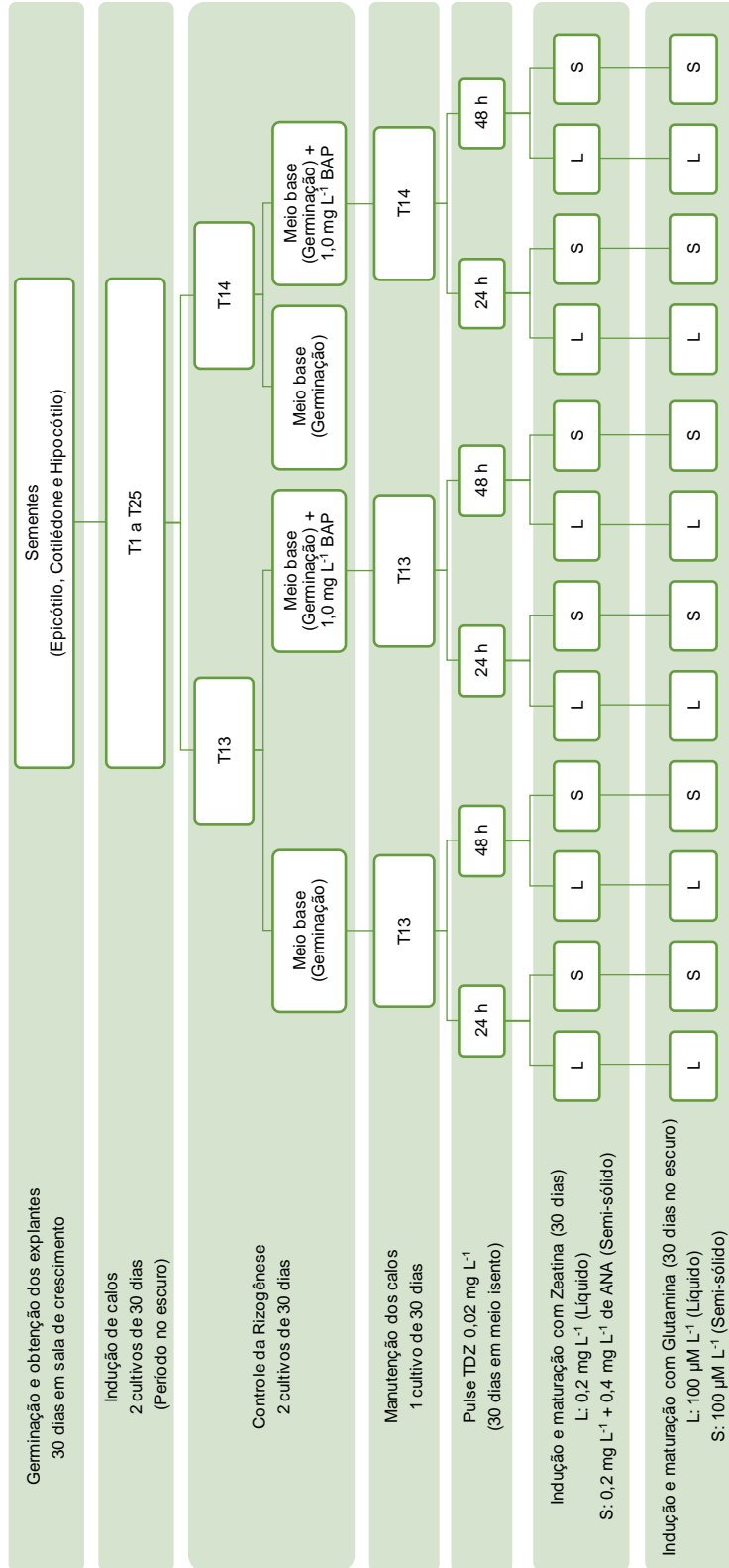


Figura 10 - Esquema representativo de todas as fases de indução da embriogênese somática. Tendo um total de 12 seqüências de estímulos, sendo que em cada seqüência foram testados os três tipo de explantes, epicótilo, cotilédone e hipocótilo

o material foi imerso em solução 2:1 (Solução A: Álcool 100%) e passado novamente a vácuo 400mmHg durante cinco minutos, e mais uma vez permaneceu descansando por duas horas em temperatura ambiente. Por fim, removeu-se a solução 2:1 e substituiu-se pela Solução A 100%, e então passado uma última vez no vácuo a 400mmHg por cinco minutos. Depois de terminado o processo de infiltração o material ficou em refrigeração por 24 horas até que o processo tenha terminado.

Passado o período de descanso para infiltração, foi realizada a emblocagem do material. Nesse processo cada um dos calos são dispostos em forminhas identificadas. O volume de solução A utilizada é aquela equivalente ao volume do número de forminhas que foram utilizadas. E o volume de Solução B (hardner) está de acordo com o volume de solução A que vem descrito pelo fabricante. Após endurecidos, o material emblocado ficou em descanso por 48 horas. Após este período cada bloco foi colado em cubinhos de madeira com Araldite, e então prontos para realizar os cortes.

Cada calo estudado foi seccionado em micrótomo rotativo manual, onde obteve-se cortes de 5,0 $\mu$ m. Para cada calo foram montadas 10 lâminas com 3 cortes cada lâmina, de forma a pegar a extensão total do material.

As lâminas confeccionadas e pré selecionadas passaram pelo método de coloração dupla com PAS (Periodic acid/ Schiff reagent) e Naphtol blue black (FISHER, 1968). O metodologia foi realizada da seguinte forma: primeiramente as lâminas foram dispostas em bercinhos de vidro com ácido periódico e incubadas por 10 minutos; em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 7 minutos, fez-se uma lavagem com água destilada, e então em ambiente escuro (bercinho coberto com papel alumínio) as lâminas foram cobertas com reagente de Schiff onde permaneceram por 15 minutos, após a remoção o reagente o material foi lavado três vezes com água sulfurosa, cada lavagem com duração de 5 minutos; fez-se, então, mais uma lavagem em água corrente por 7 minutos seguida de uma lavagem com água destilada; por fim, fez coloração com Naphtol blue black por 1 minuto e então realizada lavagem em água corrente até que a água volte a ficar transparente.

Depois de coradas, as lâminas ficaram em placa de aquecimento a 40°C até que estivessem secas (cerca de 30 minutos). Já secas foram selecionadas a lâminas a serem fotomicrografadas, e estas foram montadas com lamínulas de vidro e Entellan®.

As análises anatômicas e histoquímicas foram feitas através das micrografias obtidas com microscópio de luz ZEISS - JENEMED2 e capturadas com câmera Premiere MA88-300.

### **3.11 Análise dos dados**

Os métodos estatísticos usualmente apresentados e utilizados nas pesquisas não foram pertinentes às análises histológica e histoquímica com a coloração PAS e Naphtol blue black, assim como apresentados nos trabalhos desenvolvidas por Cao et al. (2003), Domínguez, Moreno e Cejudo (2004), Park et al. (2007), Vuosku et al. (2010), Almeida et al. (2012) e Graner (2013) uma vez que foi enfatizado alterações no potencial morfogênico nos calos obtidos ao longo da indução da embriogênese somática.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Indução de calos

Em resposta ao teste de indução de calos dois balanços foram encontrados como sendo os mais adequados, T13 e T14, representados pela combinação 1,5/1,0 e, 1,5/4,0mgL<sup>-1</sup> de picloram e BAP respectivamente. Nestes dois tratamentos todos os três explantes testados tiveram uma alta porcentagem de calogênese.

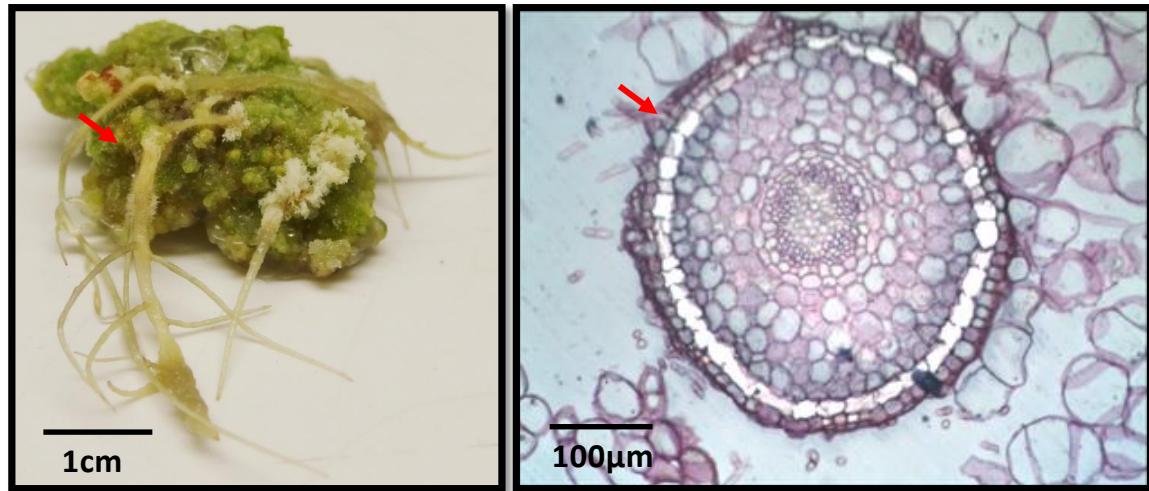
Os calos obtidos tanto em T13 quanto em T14 tinham características visuais similares. Eram grandes, com cerca de 2,0cm de comprimento, apresentavam coloração verde a verde amarelada, e quase nenhuma área oxidada. Apresentavam áreas friáveis (parte da estrutura mais amarelada), contudo sendo em sua maioria calos rígidos.

Durante a fase de indução dos calos nos tratamentos selecionados foi observado uma grande quantidade de emissão de raízes. Sendo visualizadas inclusive nas análises histológica e histoquímica.

Através das análises histológica e histoquímica foi possível identificar os tipos de células que formavam a estrutura dos calos, bem como, detectar a presença de eventos morfogênicos. Em tais análises ficou claro que tratavam-se de calos de estrutura típica, células alongadas, núcleo pouco visível, e vacuoladas. Em alguns casos, como o dos calos originários de folhas cotiledonares (Figuras 11C e 11D, Figuras 12C e 12D) ainda foi possível observar conjuntos de células apresentando alguma polaridade, o que poderiam representar a futura formação de gemas, contudo inviáveis, pois as células não apresentavam proteínas em seu conteúdo intracelular (coloração azul), o que define uma zona meristemática ativa, além da polarização.

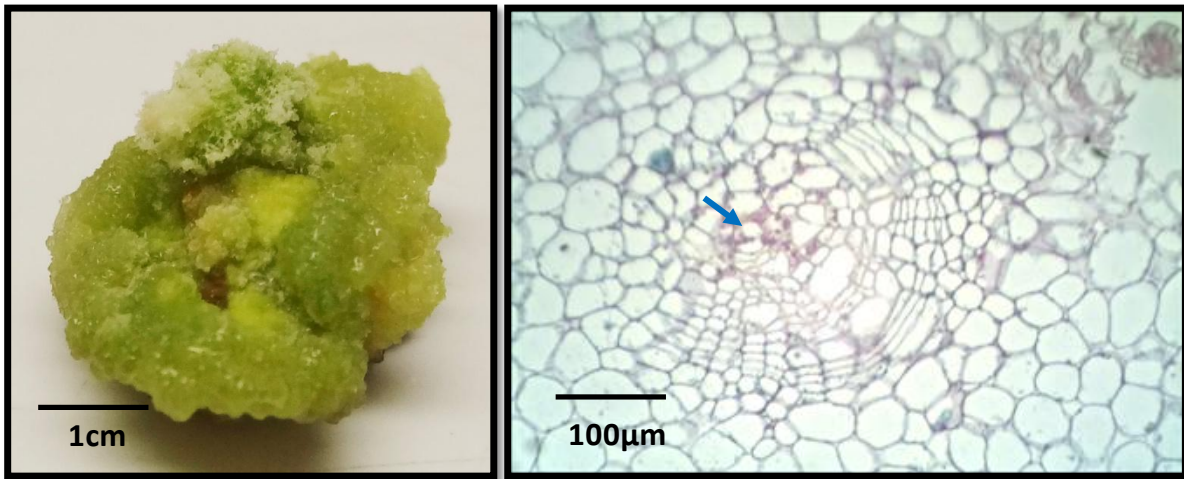
Também foi possível identificar algumas estruturas específicas, como as seções transversais de raízes, presentes em calos originados de epicótilo (Figuras 11A e 11B) e hipocótilo (Figuras 11E e 11F, Figuras 12E e 12F) em ambos os tratamentos responsivos. Em algumas células, principalmente aquelas localizadas próximas aos centros polarizados, foi verificada a presença de grãos de amido, principalmente nos calos originados dos cotilédones (Figuras 11D e 12D). Porém, até então, não foi observada a presença de linhagens de células ou eventos morfogênicos que caracterizassem a embriogênese somática.





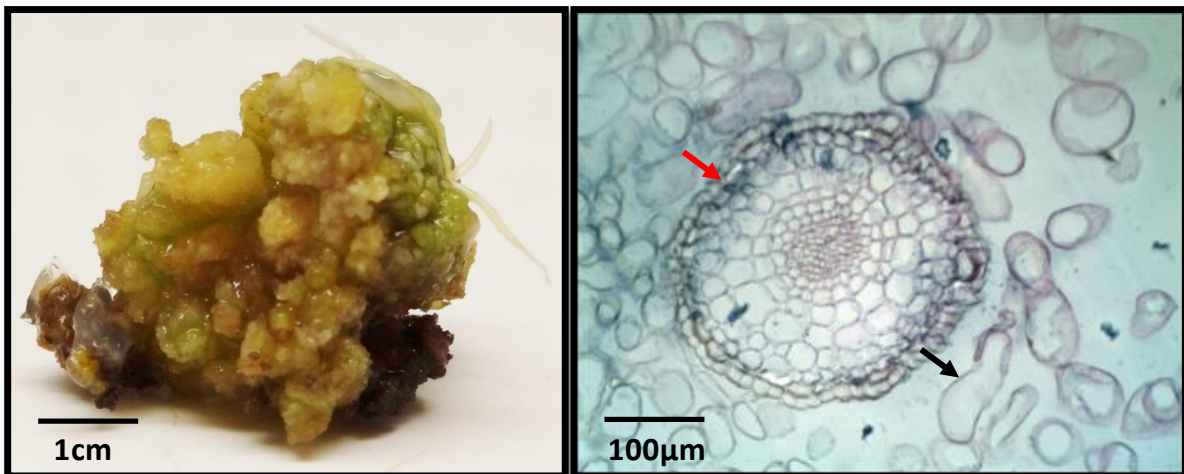
(A)

(B)



(C)

(D)



(E)

(F)

Figura 11 - Resposta do tratamento T13. As figuras A e B representam calos originados do epicótilo em T13, sendo visível a emissão das raízes (seta vermelha). As figuras C e D representam a estrutura dos calos originados de cotilédones, possibilitando verificar a presença de estrutura polarizada e células ricas em amido (seta azul). As figuras E e F representa calo originado do hipocótilo, também fica evidente a presença de raízes (seta vermelha) e células típicas de calos (seta preta)

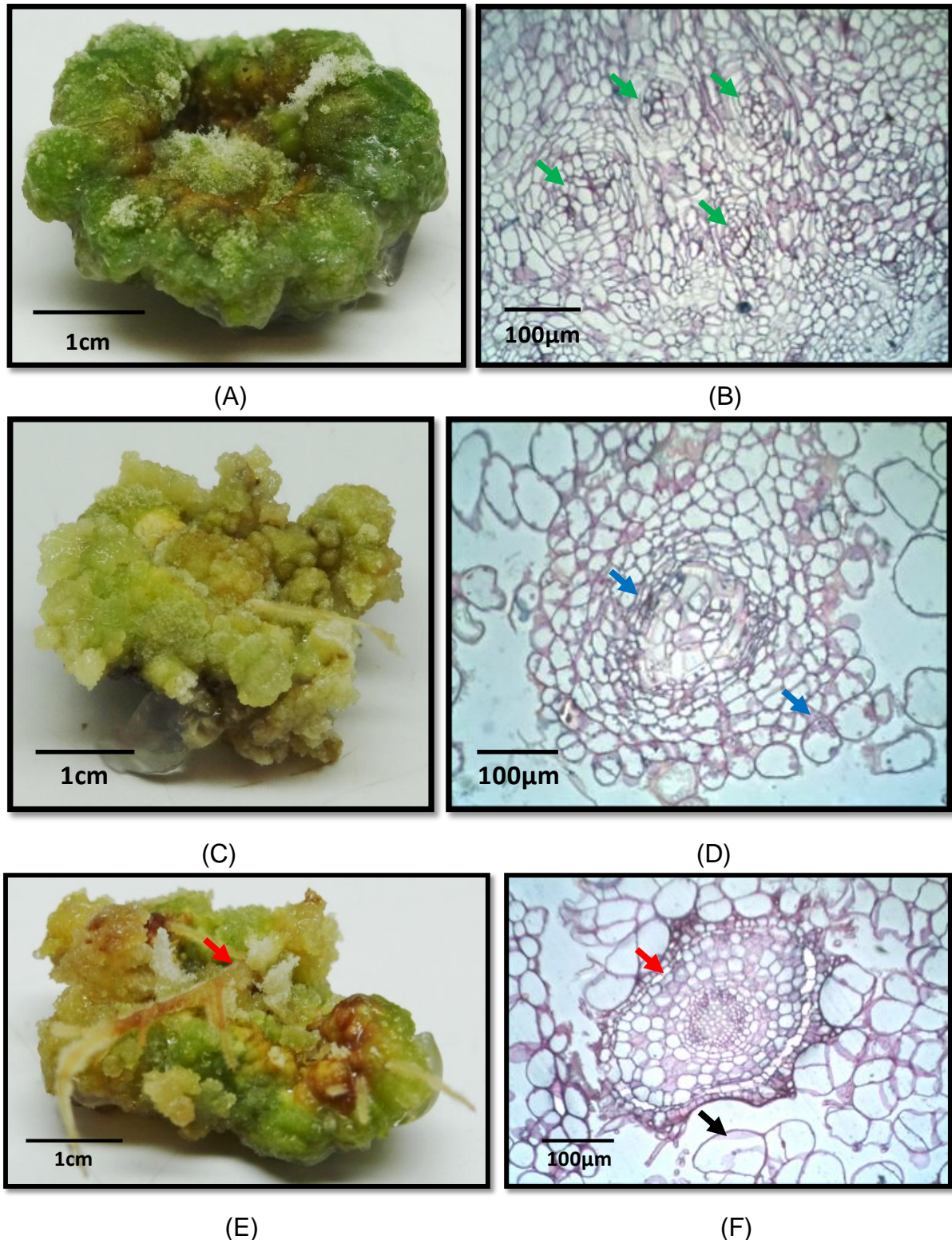


Figura 12 - Respostas do tratamento T14. As figuras A e B são calos originados de epicótilo, tais calos apresentam células típicas de calos e alguns centros polarizados (seta verde). As figuras C e D representam o material originado de cotilédones, sendo visível a presença de estrutura polarizada e células ricas em grãos de amido (seta azul). Originado do hipocótilo, o calo representado pelas figuras E e F apresenta emissão de raízes (seta vermelha), bem como presença de células alongadas e vacuoladas (seta preta)



Assim como observado na fase de indução dos calos de teca, Lim et al. (2009) observou em estudo de indução da embriogênese somática em folhas jovens de *Ocimum sanctum* que, o uso de picloram na indução de calos não foi eficaz na formação de embriões ou gemas adventícias. Bem como os tratamentos os quais a auxina não estava presente não foram capazes de desenvolver calos nos explantes. Ainda em tal trabalho, 100% dos explantes tiveram formação de calos quando cultivados em meio de cultura com adição de  $3,0\text{mgL}^{-1}$  de picloram combinado com BAP. Os calos formados, assim como os de teca, tinham estrutura compacta e coloração verde clara.

Segundo Sener et al. (2014), que estudou a indução de calos em inflorescências de *Hordeum vulgare*, a maior taxa de indução foi obtida quando utilizada a concentração de  $7,5\text{mgL}^{-1}$  de picloram, sem adição de qualquer citocinina. No trabalho ainda fica claro que a presença de picloram aumenta o tamanho dos calos, entretanto, também corroborando com os resultados encontrados nos explantes de teca, resposta embriogênica e regeneração de plantas não foram observadas.

Em trabalho realizado por Kaouther et al. (2011), em folhas jovens de cerejeira, a ausência de picloram no meio de cultura foi totalmente inibidor ao processo embriogênico. Porém, quando em presença de picloram em concentração de  $1,0\text{mgL}^{-1}$  em exposição por 30 dias 27% das folhas expostas ao tratamento apresentaram respostas embriogênicas. No mesmo trabalho ainda foi estudada a interação entre diferentes auxinas na indução de calos embriogênicos, e ficou claro que a atividade do picloram age sinergicamente com as auxinas AIA, AIB e ANA.

Observado por Ahmed, Rao e Venkateswara (2011), a indução de calos em folhas jovens e gemas de *Phyla nodiflora*, foi realizada com picloram, tendo eles conseguido resposta satisfatória quando em meio de cultura foi adicionado  $0,1\text{mgL}^{-1}$  de picloram. A resposta foi a obtenção de embriões em estágio torpedo e cotiledonar nas folhas cultivadas.

Em trabalho feito por Denchev e Conger (1995) em folhas jovens de "switchgrass", o uso de picloram sozinho, ou ainda em combinação com BAP resultaram em uma variedade de tipos de calos, contudo, com efeito muito baixo na produção de calos embriogênicos, assim como visto nas análises histológica e histoquímica nos calos de teca.

Na indução de embriogênese somática em folhas de morangueiro, Kordestani e Karami (2008) observaram que a melhor resposta foi encontrada em cultivos feitos em meio de cultura suplementados somente com picloram em concentração de  $2\text{mgL}^{-1}$ , sendo tal concentração aquela cuja houve maior número de embriões somáticos por explante responsivo.

#### **4.2 Controle da rizogênese**

Durante o experimento de controle da rizogênese foram testados dois meios de cultura, sendo o mais responsivo aquele acrescido de  $1,0\text{mgL}^{-1}$  de BAP. Após os 30 dias de cultivo em tal meio, foi possível obter calos grandes, com cerca de 2,0cm de comprimento, e assim como os calos obtidos em T13 e T14 do experimento anterior, estes apresentavam coloração verde escura a verde amarelada, porém com algumas áreas apresentando oxidação. As regiões de coloração verde claro a amarelada tinham textura friável e as demais eram rígidas.

As análises histológica e histoquímica permitiu verificar a resposta celular dos calos quanto a ausência da auxina picloram e a presença da citocinina BAP. Como primeira resposta foi possível verificar a ausência da rizogênese, sendo tal tratamento efetivo no controle da emissão de raízes pelos explantes. Além disso, foi possível observar divisões celulares semelhantes às ocorridas durante o processo de embriogênese somática, isto é, divisões assimétricas com polarização sendo encontradas estruturas similares a pró-embriões, principalmente nos calos originários de epicótilo induzidos no tratamento T13 (Figuras 13A a 13F) e cotilédones originados no tratamento T14 (Figuras 13G a 13I) sendo ambos cultivados em meio de cultivo contendo BAP durante o controle da rizogênese.

Embora através do estudo histoquímico tenham sido observadas ainda células com padrões não desejados (alongadas, vacuoladas e grãos de amido) (Figura 13C), também foram encontrados estruturas pró-embriônicas, principalmente na região subepidérmica do calo (Figuras 13F e 13H), com as seguintes características: divisão celular polarizada, células com núcleo denso (azul) junto à parede celular representando a divisão, e a presença de mucilagem contornando a estrutura, demonstrando ser uma estrutura independente. Tal resultado está de acordo com a citação de Margara (1982) que diz que o aumento da relação núcleo/citoplasma observado durante o desenvolvimento do processo embriogênico pode ser o reflexo do grau de desdiferenciação das células.

Neste experimento, tanto para os calos provenientes de T13 quanto T14, os explantes mais responsivos foram epicótilo e cotilédone.

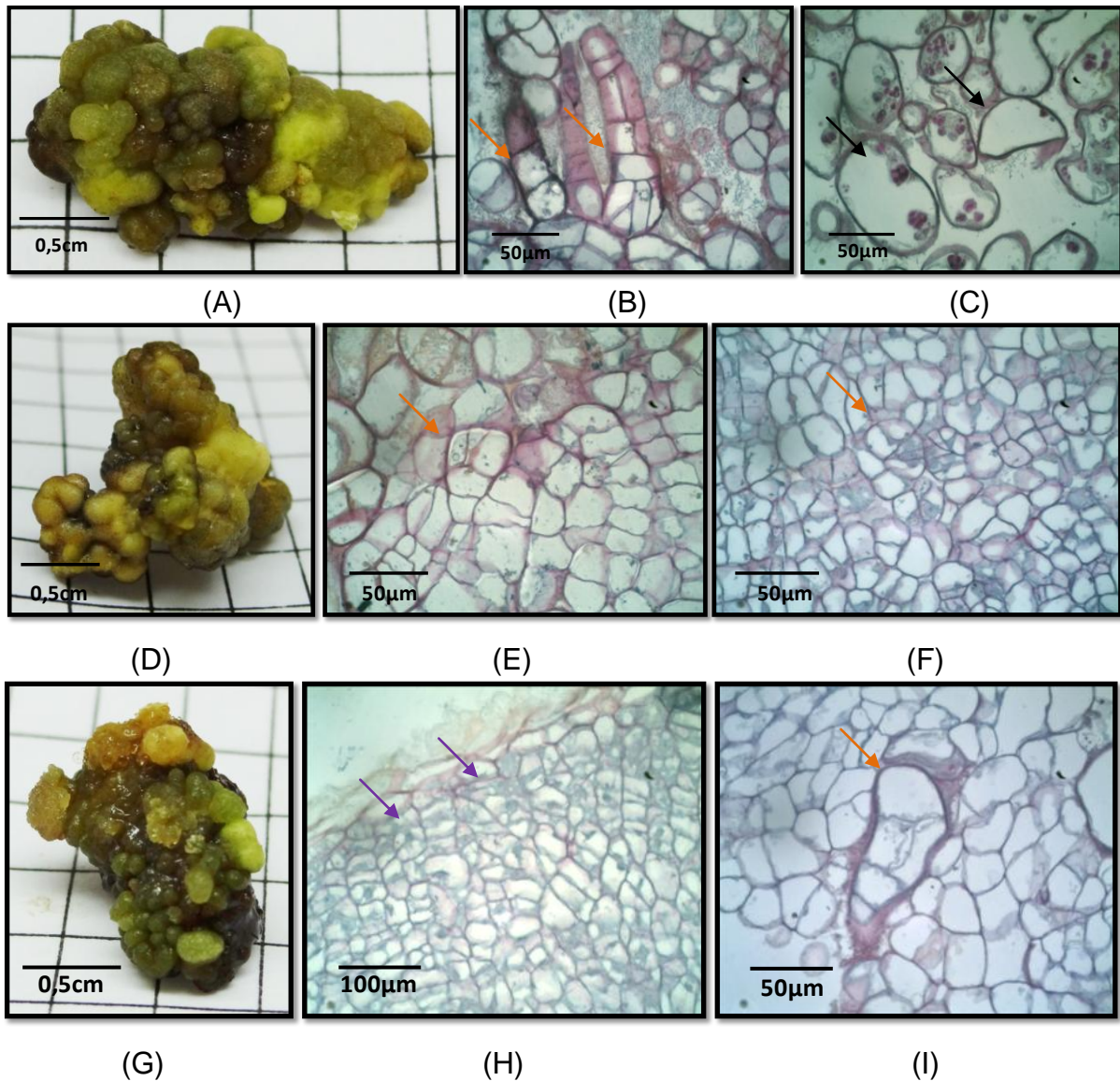


Figura 13 - As figuras reportam as melhores respostas encontradas durante a fase de controle da rizogênese. Sendo as figuras A-F os resultados obtidos em calos originários de epicótilo em T13, e cultivados em meio de cultivo com adição de BAP. Tais calos apresentam estruturas pró-embriogênicas (setas laranjadas), bem como células típicas (setas pretas). As figuras G-I representam o melhor resultado para calos originados em T14. Originado de cotilédone, e cultivado em meio com adição de BAP durante o controle da rizogênese, é possível visualizar células sub epidérmicas com características meristemáticas (setas roxas), bem como a presença de estruturas pró-embriônicas (seta laranjada)

Segundo Haberer e Kieber (2002), as citocininas são conhecidas por estarem envolvidas em múltiplos processos de desenvolvimento da planta, incluindo a rizogênese. De acordo com Laplaze et al. (2007), em estudo feito com plântulas

recém germinadas de *Arabidopsis*, a presença de cinetina no meio de cultura em concentração  $1\mu\text{ML}^{-1}$  reduziu fortemente o crescimento de raízes.

No trabalho realizado por Wolter (1968) em calos de Aspen, citocininas como cinetina e BAP foram inibitórias a rizogênese, e mesmo em concentrações mais baixas que  $0,25\text{mgL}^{-1}$  em meio de cultura e na presença de concentrações ótimas de auxina, houve a prevenção de formação de raízes. Tal resultado é compatível com o controle da rizogênese proposto para os calos de teca.

O uso de citocininas para controle da rizogênese durante a indução de calos também foi estudada em milho. Bednar e Bednar (1972) encontraram que a presença de citocininas no meio, em certas concentrações, causam importantes mudanças na estrutura dos calos, bem como na produção de raízes. Os dados destes pesquisadores mostraram que o enraizamento de calos podem ser controlados com o uso de uma razão citocinina/auxina moderada a alta.

### **4.3 Manutenção dos calos**

Embora durante experimento de controle da rizogênese já tenha sido notado resultados esperados na indução de embriogênese, os calos naquela ocasião pararam o crescimento e pouco se diferenciaram visualmente da fase de indução (tópico 4.1). Logo, foi realizado um cultivo do material novamente nos balanços auxina/citocinina originais (T13 e T14 encontrados como melhor resposta no tópico 4.1) para estudar uma possível volta da emissão de raízes, assim como, a ocorrência de embriões somáticos, isto é, desenvolvimento dos pró-embriões encontrados.

Como resposta a esta fase de manutenção foram obtidos calos de aproximadamente 1,5cm de comprimento, de coloração amarela amarronzada, evidenciando a oxidação do tecido. O tecido de coloração amarelada apresentava aspecto friável, e os mais enegrecidos mais rígidos. Nesta fase não foi observada a rizogênese.

Os calos induzidos originalmente em T13, e passados pelo controle da rizogênese em meio isento de fitoreguladores apresentaram grupos de células em divisões assimétricas de forma polarizada, caracterizando um pró-embrião, presentes principalmente em calos originados de epicótilo e cotilédones (Figuras 14B e 14D). Embora tivessem uma divisão característica do processo de embriogênese somática e fossem rodeadas por mucilagem (coloração rosa), estas células eram

vacuoladas, sendo, desta forma, inviáveis. Pois o crescimento dos vacúolos podem estar relacionadas ao estágio avançado de diferenciação e perda da competência da célula (THORPE e PATEL, 1984). Ainda nos calos que passaram por tais fases e tratamentos foi possível identificar células ricas em amido.

Já os calos originados em T13 e que passaram por controle da rizogênese em meio contendo BAP apresentaram células com conteúdo nuclear bem denso (coloração azul), principalmente nas áreas próximas à superfície epidérmica do calo, caracterizando células com potencial meristemático quanto ao padrão de divisão celular, verificado principalmente nos calos provenientes de cotilédones (Figuras 15C e 15D). Este tipo de resposta também foi encontrado em calos obtidos de cotilédones de *Camellia japonica*, estudados por Barciela e Vieitez (1992), as camadas abaixo da superfície epidérmica apresentavam células pequenas, com vacúolos menores e citoplasma denso. Estas células se multiplicaram e provaram ser células pró-embriogênicas, as quais, passaram por sucessivas divisões e passaram a formar um grupo de células isodiamétricas com microvacúolos contendo amido e com núcleos grandes, características associadas a células embriogênicas.

Nestes calos também encontraram-se estruturas similares a pró-embriões, como citados anteriormente, porém inviáveis, assim como o observado no calo originário de epicótilo (Figuras 15A e 15B).

Originados do T14, os calos que passaram por controle da rizogênese com BAP continuaram a apresentar células típicas de calo, alongadas, vacuoladas e, núcleo imperceptível, independente do tipo de explantes original (Figuras 16A a 16F). Através da análise histoquímica foi possível encontrar a presença de compostos fenólicos dentro das células, assim como nos espaços intracelulares (coloração laranja).

Em nenhum dos tratamentos de manutenção foi diagnosticado a rizogênese, sendo tal processo controlado com o experimento anterior. Dentre as respostas obtidas até este momento, as mais interessantes são as encontradas nos calos provenientes de T13 (originalmente cotilédone, e epicótilo), os quais passaram pelo tratamento com BAP no experimento anterior.



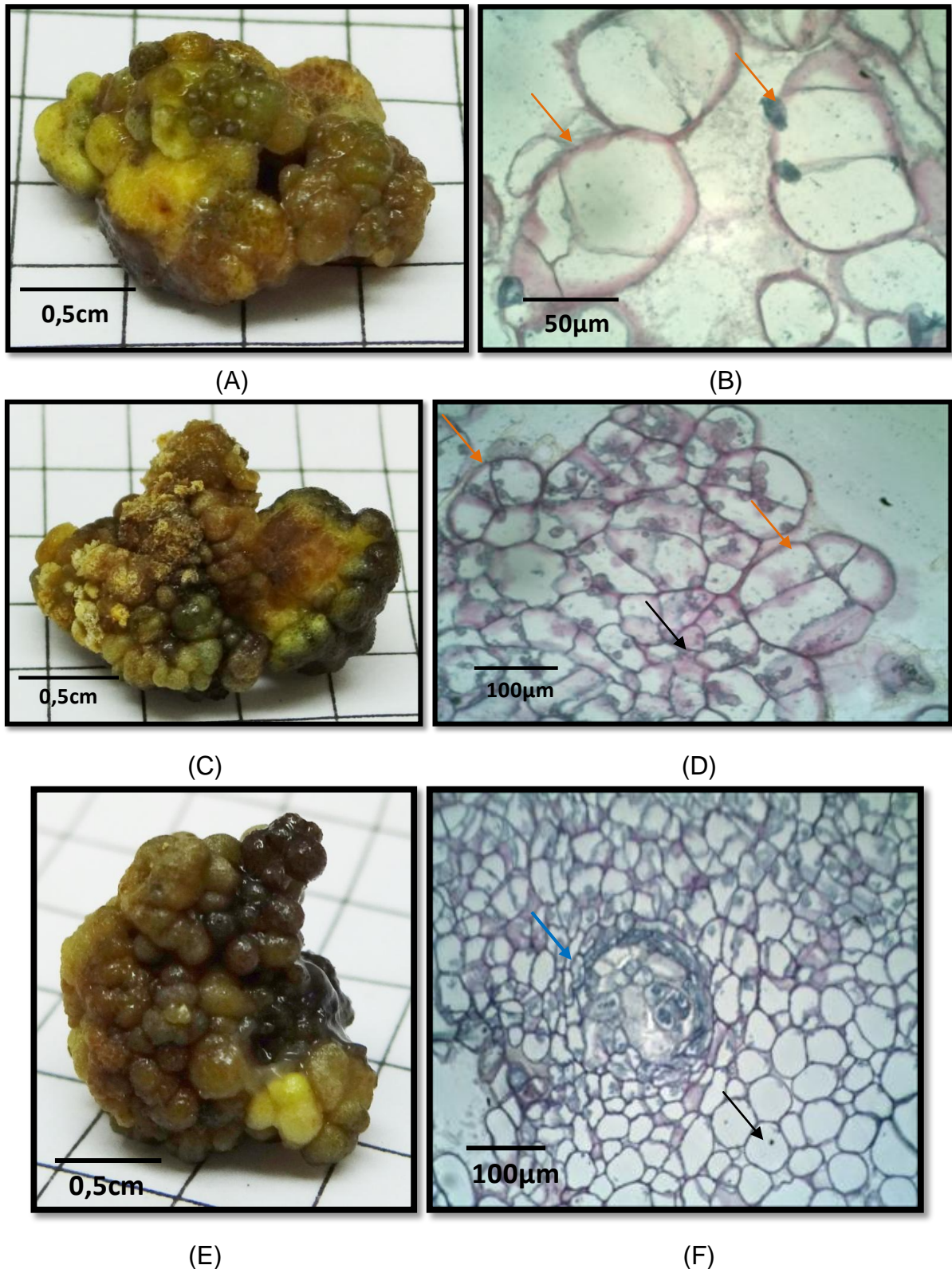
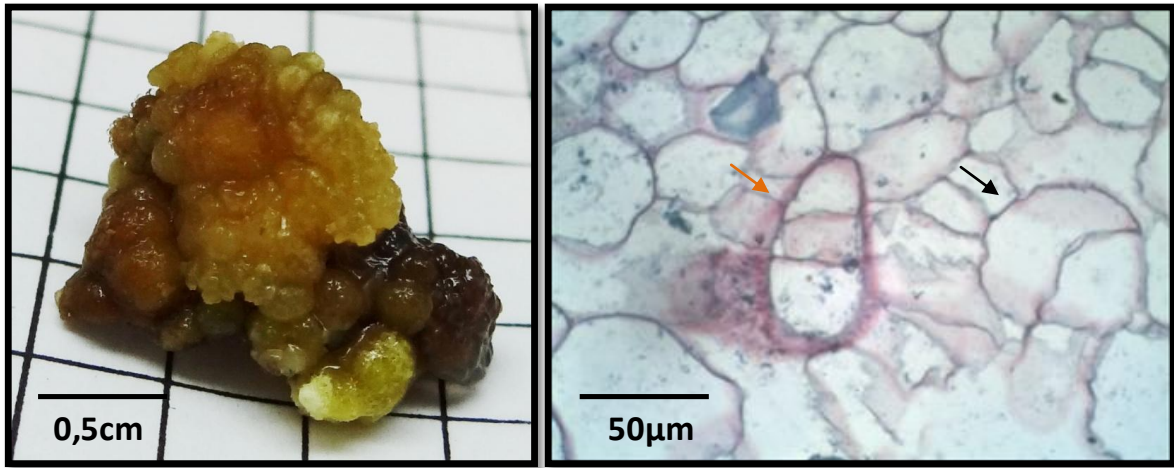


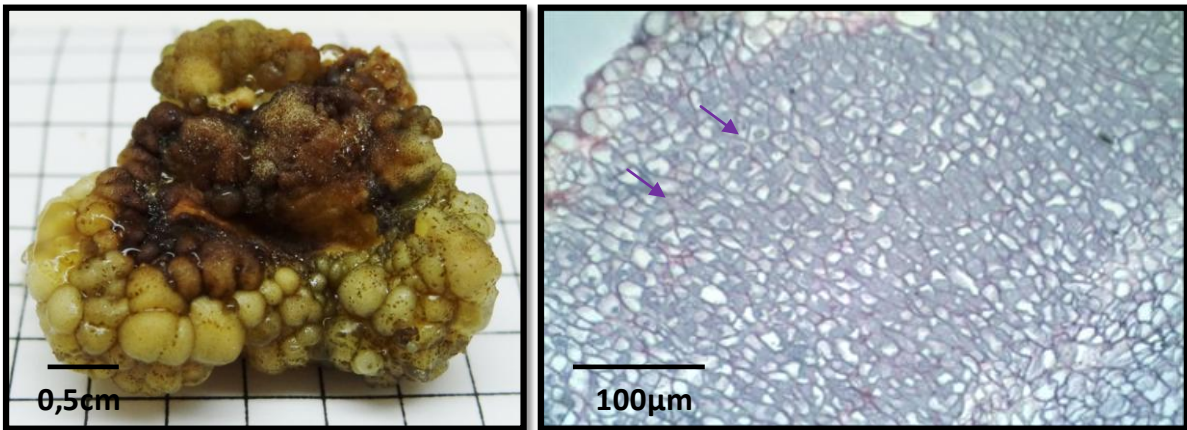
Figura 14 - As figuras A-F representam os resultados obtidos nos calos mantidos em T13 e cultivados em meio para controle da rizogênese isento. As figuras A e B, C e D, apresentam os calos originados de epicótilo e cotilédone respectivamente. Nestas estruturas é possível visualizar a presença de estruturas pró-embriogênicas inviáveis (seta laranjada), além da presença de células típicas ricas em grãos de amido (seta preta). As figuras E e F são a resposta de calo originado de hipocótilo, e apresentam células típicas (seta preta), além de estrutura similar a meristemóide, com células de núcleo denso e polarizadas (seta azul)





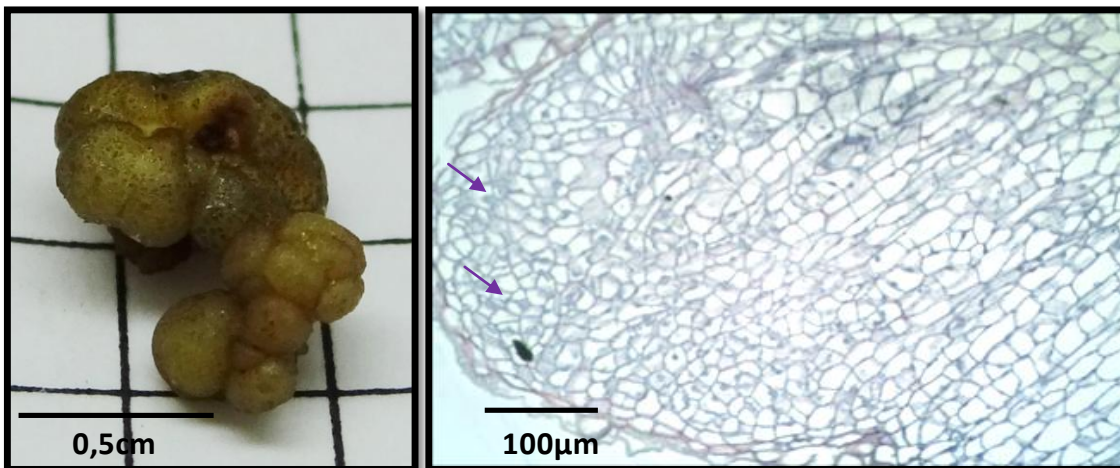
(A)

(B)



(C)

(D)



(E)

(F)

Figura 15 - As figuras A-F representam os resultados obtidos nos calos mantidos em T13 e cultivados em meio para controle da rizogênese com adição de BAP. As figuras A e B representam calo originado de epicótilo, que apresenta células típicas (seta preta), mas também apresenta estrutura pró-embriônica (seta laranja), embora inviável. As figuras C e D, E e F, são os resultados observados em calos originários de cotilédones e hipocótilo, respectivamente. Tendo como principais características células de caráter meristemático nas regiões sub-epidérmicas (seta roxa)

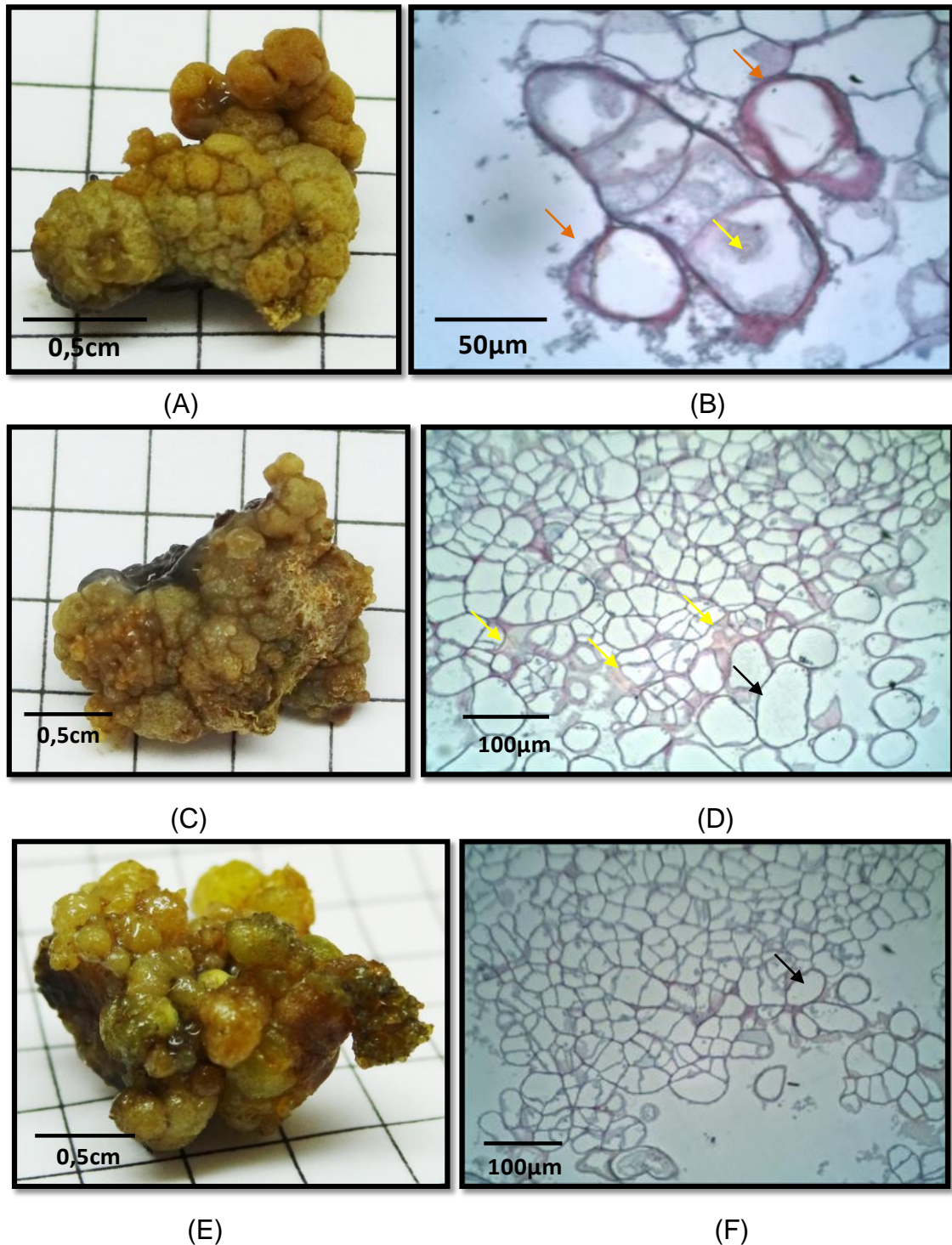


Figura 16 - O quadro representa os resultados encontrados para os calos mantidos em T14, e cultivados em meio contendo BAP para controle da rizogênese. A e B são as respostas encontradas para calos originados de epicótilo, apresentam algumas divisões assimétricas, porém ainda em estágio pouco avançado (seta laranjada), também se inicia o processo de oxidação dos calos, e pode-se verificar a presença de compostos fenólicos (seta amarela). As figuras C e D representa calos originados de cotilédones, com células em sua maioria de característica típica (seta preta), e presença de compostos fenólicos no espaço intercelular (seta amarela). A resposta de calos originados de hipocótilo estão disponíveis em E e F, contudo, apresentam características celulares típicas (seta preta)

Após a indução dos calos em explantes primários é necessário a manutenção do crescimento e desenvolvimento do tecido. Em geral, utiliza-se o

mesmo meio de indução para manter a calogênese. Porém, em trabalho realizado em calos de timbó vermelho, Souza et al. (2010) observaram que a melhor resposta para manutenção da calogênese foi proporcionada por tratamento formulado com meio de cultura suplementado com  $2,0\text{mgL}^{-1}$  de ANA em conjunto com  $2,0\text{mgL}^{-1}$  de BAP.

Observado por Benedito, Filho e Mendes (2000) em calos de laranja doce, a manutenção dos calos em subcultivos mensais foi realizada com sucesso em meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento.

Considerando o uso de outra auxina na indução e manutenção da calogênese na obtenção de embriões somáticos, Ziauddin e Kasha (1990) verificaram para calos de *Hordeum vulgare* que o maior crescimento de calos embriogênicos em fase de manutenção foi em meio de cultura com baixas doses de 2,4D (0,1 e  $1,0\text{mgL}^{-1}$ ).

Segundo Oliveira et al. (1994) em estudo realizado com cacto (*Cereus peruvianus*), o método de indução e manutenção de calos mais adequados para produção em massa da espécie foi aquele em que o meio de cultura utilizado foi suplementado com concentrações similares de 2,4D e cinetina ( $18,1\mu\text{M}$  de 2,4D e  $18,6\mu\text{ML}^{-1}$  de cinetina).

Quanto a presença de compostos fenólicos nos tecidos dos calos de teca na fase de manutenção, alguns trabalhos explicam a função de tais substâncias durante o processo de obtenção de embriões somáticos. Zavattieri et al. (2010) afirma que a indução do estresse oxidativo aumenta os níveis de auxina nas células e promove a desdiferenciação (PASTERMAK et al., 2002; CORREA-ARAGUNDE et al., 2006). Otvos et al. (2005), trabalhando com cultura celular de alfafa, também mostraram que a presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e óxido nítrico tem um efeito promotor sobre a embriogênese somática. O óxido nítrico estimulou a ativação da divisão celular e a formação de embriões em folhas de alfafa em presença de auxina.

Ganesan e Jayabalan (2004) mostraram que a adição de hemoglobina no meio de cultura aumentou a eficiência da embriogênese somática em algodão, pois o estresse causado pelo aumento dos níveis de oxigênio induziu o crescimento dos tecidos dos calos.



#### 4.4 Pulse em TDZ

Após a fase de manutenção foi realizado o experimento de pulse com TDZ ( $0,02\text{mgL}^{-1}$ ) para verificar a eficiência de tal regulador no desenvolvimento dos pré-embriões encontrados até a fase anterior.

Os calos os quais permaneceram em pulse durante 24 horas tiveram como principal característica visual a oxidação. Todos eles ficaram enegrecidos, apresentando pouco tecido de coloração verde ou amarelada. A estrutura desses calos ficaram organizadas em pequenos conjuntos esféricos de tecidos (nódulos), os quais ao serem manuseados se desconectavam. O comprimento médio dos calos nessa fase foi de 1,0cm. O pulse de 24 horas promoveu a divisão celular assimétrica, polarizada, dando origem a conjuntos de células circundadas por mucilagem, porém todas estas estruturas não apresentavam citoplasma denso, ou seja, havia pouca proteína, o que é representaria o processo de atividade meristemática da célula (divisão celular). Tal evento foi encontrado para calos provenientes dos três tipos de explantes, epicótilo (Figuras 17A e 17B), cotilédones (Figuras 17I e 17J) e hipocótilos (Figuras 17C a 17F), tanto com calos induzidos em T13 quanto em calos induzidos em T14. A melhor resposta encontrada até aqui foram nos calos originados de hipocótilos, induzidos com tratamento T14. Estes calos apresentaram células em divisão assimétrica, com características pré-embriogênicas (Figura 17D), além de induzirem a polarização de zonas as quais as células apresentavam características meristemáticas (Figura 17F).

Contudo, o material que anteriormente passou por tratamento de controle da rizogênese em meio isento de reguladores não apresentou resultado expressivo.

Assim como visto nas demais fases da indução de embriogênese até então, as células abaixo da epiderme apresentaram grande conteúdo de grãos de amido, observado principalmente em calos induzidos em T14, provenientes de epicótilos (Figura 17H).

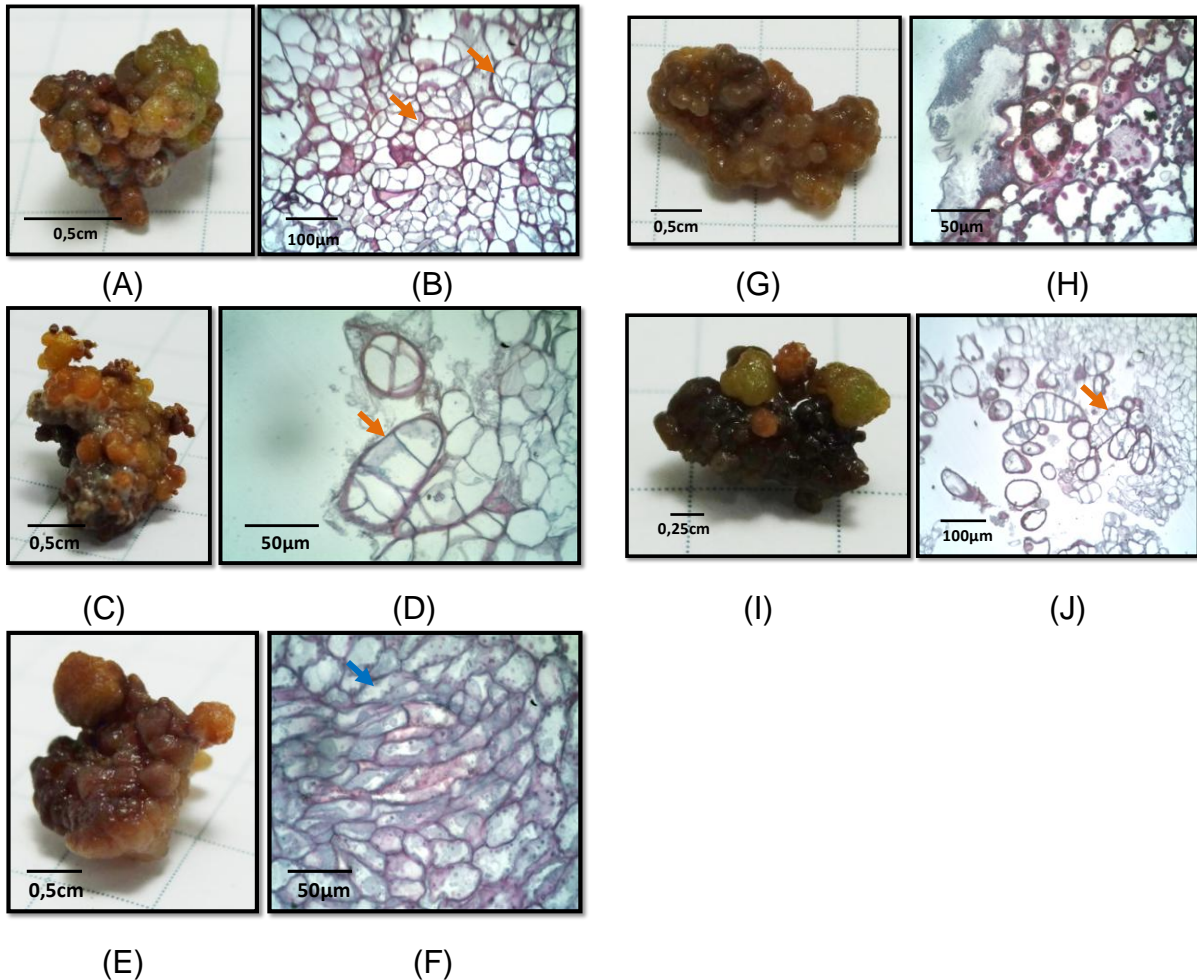


Figura 17 - As figuras representam os resultados mais expressivos obtidos com o pulso de 24 horas. Sendo todo material responsivo cultivado em meio contendo BAP durante a fase de controle da rizogênese. A e B mostram a resposta de calos provenientes de epicótilo, induzidos em T13, com células em divisão assimétrica e separadas por mucilagem (seta laranjada), caracterizadas como estruturas pró-embriogênicas. Assim como observado para calos induzidos em T14 originados de hipocótilo e cotilédone (C e D, I e J, respectivamente). Calos provenientes da indução em hipocótilos em T14 (E e F) ainda visualizou-se estruturas polarizadas com atividade celular (seta azul), indicando similaridade a um meristemóide. Embora os calos apresentassem visualmente sinais de oxidação, não foi detectada a presença de compostos fenólicos

O pulso de 48 horas teve resultado similar ao de 24 horas. Os calos submetidos a tal tratamento também apresentaram oxidação e enegrecimento do tecido, porém mais acentuado do que no primeiro caso. A estrutura de tais calos ainda se mostravam mais rígidas e coesas, isto é, não havia separação de tecido quando manuseados. Quanto ao padrão de divisão celular em tais calos, este foi similar ao encontrado no tratamento citado anteriormente. Apresentavam divisão assimétrica, dando origem a conjuntos de células similares a pró-embriões, sendo estes circundados por mucilagem, sendo encontradas principalmente nos calos provenientes da indução em meio de cultura T13, os quais foram cultivados em meio

isento durante o processo de controle da rizogênese. Sendo os explantes mais responsivos epicótilo (Figuras 18A e 18B) e hipocótilo (Figuras 18C e 18D). Em menor ocorrência também foram encontradas regiões de atividade meristemática, com conjunto de células polarizadas e com citoplasma denso, presentes nos calos induzidos em T14 originados de hipocótilo (Figuras 18I e 18J). Diferente do encontrado anteriormente, as células ricas em grãos de amidos não se encontravam na periferia dos calos, mas sim próximas as regiões de maior atividade celular, como observado nos calos originados de T14 em hipocótilo (Figura 18J). Muito é reportado sobre o acúmulo de amido pelas células circundantes de áreas responsivas tanto na organogênese quanto na embriogênese (THORPE e MURASHIGE, 1970; BROSSARD, 1977; THORPE, 1983). Tal amido acumulado seria a fonte de energia no sucesso das divisões de células meristemáticas (STAMP, 1987; REDWAY, 1991).

Ainda como resultado do pulse de 48 horas, foi possível encontrar células em processo de morte celular, caracterizada principalmente pela ausência de citoplasma denso, e até mesmo do vacúolo, já havendo a retração da membrana citoplasmática (Figura 18B).

Em ambos os tratamentos (24 e 48 horas), as estruturas com divisões celulares semelhantes a pró-embriões se mostravam inviáveis, pois não apresentavam nenhuma substância ergástica (proteínas) que demonstrasse atividade celular.

Diferentemente do encontrado até agora no processo de indução, nesta fase a melhor resposta foi encontrado nos calos provenientes de hipocótilo cultivos em T13 passado pelo pulse de 24horas.

Em indução da embriogênese somática realizadas em folhas jovens de cupuaçu, Ferreira et al. (2005) puderam observar que calos que permaneceram em meio de cultura contendo TDZ após uma semana tiveram um maior crescimento, ocorrendo a diferenciação de estruturas com aparência pró-embriogênicas na massa calosa, assim como observados nos calos de teca quando passados pelo pulse. Tais estruturas tinham aspecto globular, e tornavam-se mais densas a medida que cresciam. No mesmo trabalho, estruturas semelhantes a embrióides apareceram em pequenos grupos ou em forma de cachos sobre a superfície de tecido foliar cultivado em meio contendo TDZ ( $2,2\text{mgL}^{-1}$ ).

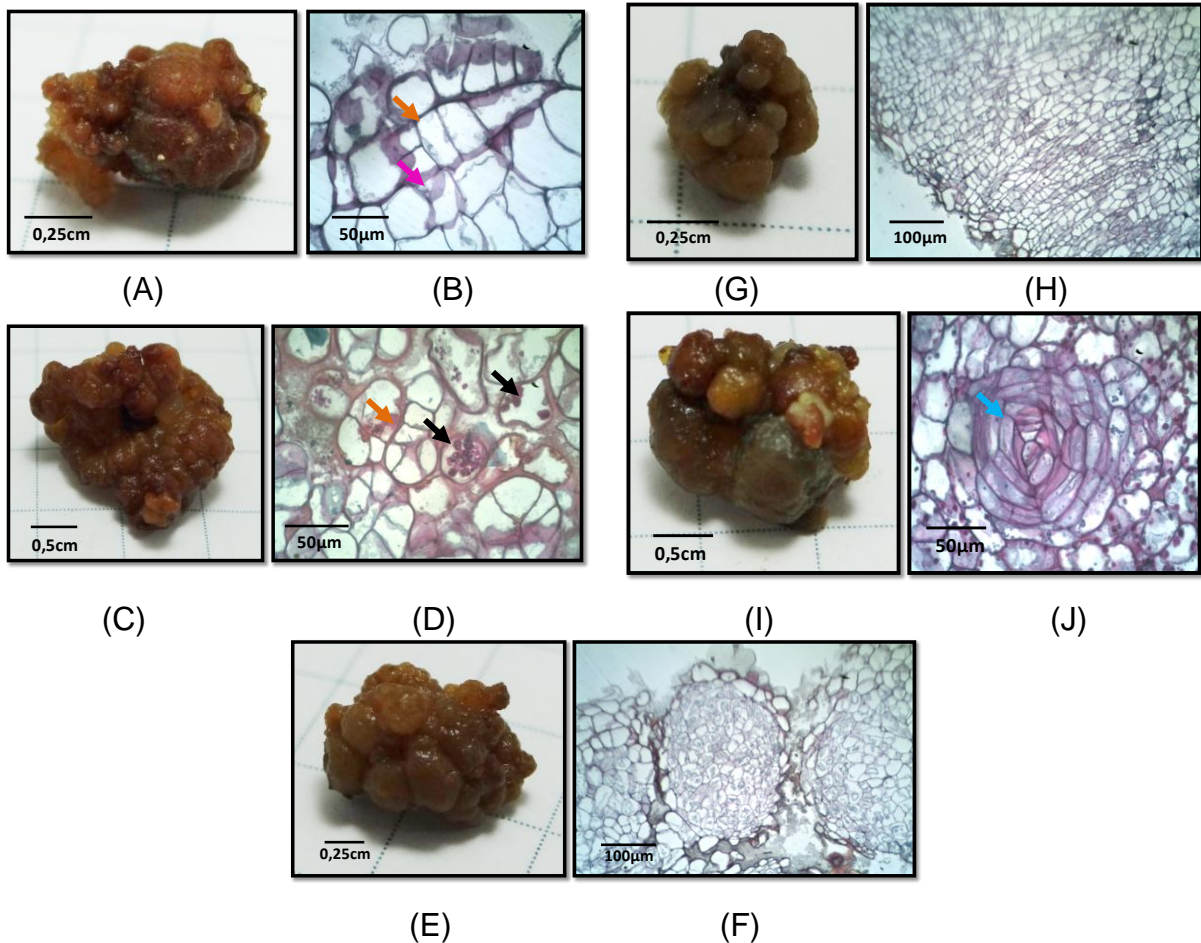


Figura 18 - O pulso de 48 horas apresentou resultado promissor para aqueles calos que não passaram por cultivo em meio acrescido de BAP, como representado pelos calos de epicótilo e hipocótilo induzidos em T13 (A e B, C e D, respectivamente). Estes calos apresentaram células com características pró-embriogênicas (seta laranja), e células próximas as áreas da divisão assimétrica ricas em grãos de amido (seta preta). Em calos provenientes de T14, cuja indução ocorreu em hipocótilos, após o pulso de 48 horas apresentaram estruturas polarizadas, com células ricas em proteínas, caracterizando um meristemóide (I e J) (seta azul). A oxidação aparente nos calos, não foi evidenciada com a presença de compostos fenólicos. Contudo foi possível visualizar a retração da membrana plasmática em algumas células, caracterizando a morte celular programada existente durante a indução da embriogênese somática (seta rosa)

Contudo, tais estruturas foram em seguida transferidas para meio de regeneração a fim de estimular o completo desenvolvimento do embrião. Uma semana após a transferência, observou-se que as estruturas estavam mais densas, com aspecto escuro e secaram.

O uso do TDZ no meio de cultura para indução de embriogênese somática tem sido descrita para muitas espécies (HUTCHINSON et al., 1996; ZHANG et al., 2001), porém em trabalho realizado com pulso de TDZ para estudar a morfogênese *in vitro* de pupunheira, Graner (2013) cita que nenhum dos tratamentos usados resultaram na obtenção de embriões somáticos, resultado similar ao encontrado nos

calos de teca, que embora tivessem estruturas pró-embriogênicas, estas eram pouco frequentes e não se desenvolveram em embriões.

Saxena et al. (1992) reportou a embriogênese somática direta em plântulas de amendoim quando estas foram germinadas em meio suplementado com 10 $\mu$ M de TDZ. Os pesquisadores observaram que os embriões foram induzidos na região apical e na superfície dos cotilédones e hipocótilo das plântulas.

Ainda em estudos com amendoim, Akasaka et al. (2000) notou que TDZ foi a citocinina mais eficiente para indução de gemas em segmentos de folhas quando tais tecidos eram cultivados em meio de cultura contendo 10mgL<sup>-1</sup> durante 7 dias, ou 1,0mgL<sup>-1</sup> durante 21 dias.

Matand (2007) encontraram que o uso do TDZ em diferentes tempos de exposição em diferentes explantes de amendoim foi eficiente para indução de gemas. Ainda neste estudo foi mostrado que o hipocótilo foi o explante mais responsivo quanto ao número de gemas emitidas.

#### **4.5 Indução e maturação com zeatina**

No experimento com zeatina foram realizados dois tratamentos, sendo o primeiro o cultivo dos calos em meio líquido em presença do fitorregulador, e o segundo meio de cultura, semi-sólido com adição de zeatina em conjunto com ANA.

Como resultado do primeiro tratamento foram obtidos calos pequenos, com 1,0cm de comprimento. Quanto a coloração estes eram amarelo escuro a marrom escuro, e suas texturas embora não apresentassem visualmente aspecto friável eram formado por tecido de fácil desestruturação.

Através das análises histológica e histoquímica foi possível identificar zonas periféricas próximas a epiderme, as quais as células mantiveram características meristemáticas, sendo elas isodiamétricas com conteúdo citoplasmático denso, representado pela quantidade de proteína produzida e acumulada, evidenciando a atividade celular (Figuras 19A e 19B), presentes em calos originários de epícótilo induzidos em T13, passados pelo controle da rizogênese em meio de cultivo com BAP, e pulse de 24h. As regiões em que as divisões se apresentavam assimétricas e polarizadas foram marcadas pela morte celular, sendo visível em grande parte do tecido a retração da membrana plasmática das células (Figuras 19D e 19N). Sendo tal evento presente em calos originados de diferentes tipos de explantes.



Nas mesmas regiões foi possível encontrar células apresentando degradação de proteínas, além da presença de compostos fenólicos intracelular (Figuras 19F e 19L). Até então, nas fases anteriores de indução, foram encontradas células com grande quantidade de grãos de amido, o que não ocorreu nesta fase.

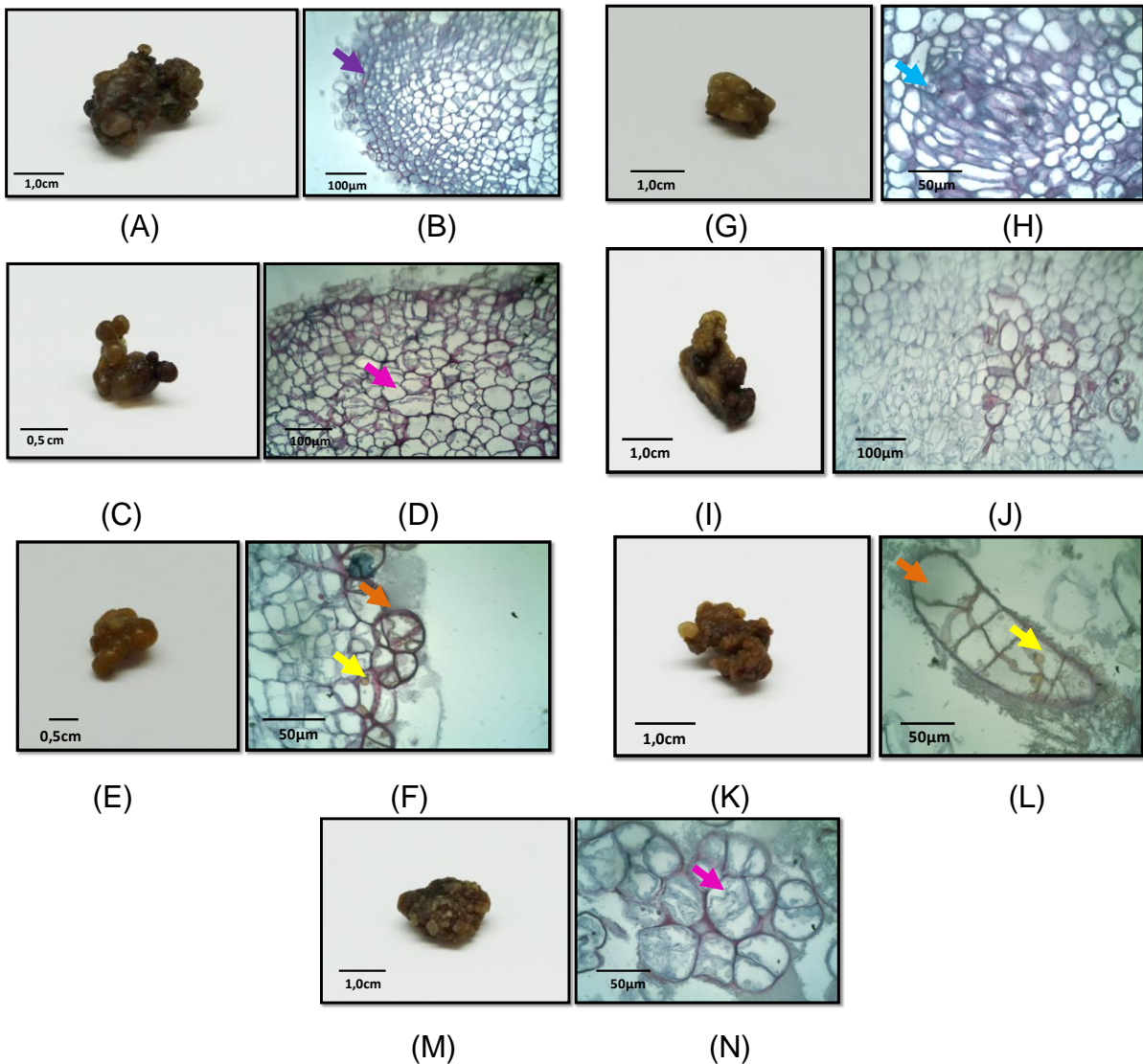


Figura 19 - Respostas para zeatina em meio líquido. Através da observação das figuras é possível perceber que neste momento os calos já pouco respondem aos estímulos dados. As melhores respostas foram encontradas nos calos originados de epicótilos, induzidos em T13, com controle da rizogênese realizado na presença de BAP, passados pelo pulso de 24 horas (A e B) e pelo pulso de 48 horas (C e G). Nestes calos ainda estavam presentes células com citoplasma denso e característica meristemática (B)(seta roxa), além de apresentar polarização em determinados conjuntos de células (H)(seta azul). A morte celular programada fica evidente pela retração da membrana plasmática, ocorrida principalmente nos calos originados de cotilédones, em indução no T13, com controle da rizogênese em meio com BAP, e pulso de 24h (D) e 48 horas (N) (seta rosa). Estruturas com divisão assimétrica (seta laranjada) foram encontradas somente em calos originados de hipocótilos, em meio de indução T13 (F) e T14 (L), com controle da rizogênese em meio suplementado com BAP, e tratados com pulso de 24h (F) e 48h (L), ainda nestas estruturas ficou visível a presença de compostos fenólicos (seta amarela). I e J representam o resposta de calos originado de hipocótilo, induzido em T13, com controle da rizogênese em meio com BAP, e pulso de 48horas, porém sem resposta morfogênica

Essas respostas estão de acordo com o que foi encontrado por Cangahuala-Inocente et al. (2009), em trabalho realizado com *Camellia japonica* onde uma forte zona de acúmulo de amido foi detectada durante a formação de nódulos na estrutura dos calos. E assim que esses nódulos passavam a apresentar características pró-embrionárias as células subjacentes apresentavam menor quantidade de amido. Os nódulos que não apresentavam células próximas que tinham amido não conseguiram evoluir para células pró-embriogênicas..

Os calos obtidos no tratamento em que foram usados zeatina e ANA em conjunto também eram pequenos com comprimento aproximado de 1,0cm. Quanto a coloração eram calos escuros, que variavam do amarelo escuro ao marrom escuro, apresentando muita oxidação. Quanto a textura eram coesos, diferentemente do obtido no tratamento anterior.

Neste tratamento os calos eram formados por tecidos típicos, células alongadas e vacuoladas. As divisões assimétricas e polarizadas foram encontradas somente em calos originados de epicótilo, e induzidos no tratamento T14, passando por pulse de 24 horas (Figuras 20E e 20F) e 48 horas (Figuras 20C e 20D) e, quando encontradas, se tratavam de um conjunto de células (circundados por mucilagem) inviáveis para determinação de qualquer futuro evento morfogênico. Assim como no tratamento anterior, grande parte das células dos calos se encontravam em morte celular, representado pela retração da membrana plasmática (Figuras 20A e 20B).

A melhor resposta foi encontrada no tratamento a qual foi somente usada a zeatina, e para aqueles calos induzidos em T13, tanto aqueles que passaram pelo pulse de 24 quanto 48 horas, sendo o explante original mais responsivo o epicótilo.

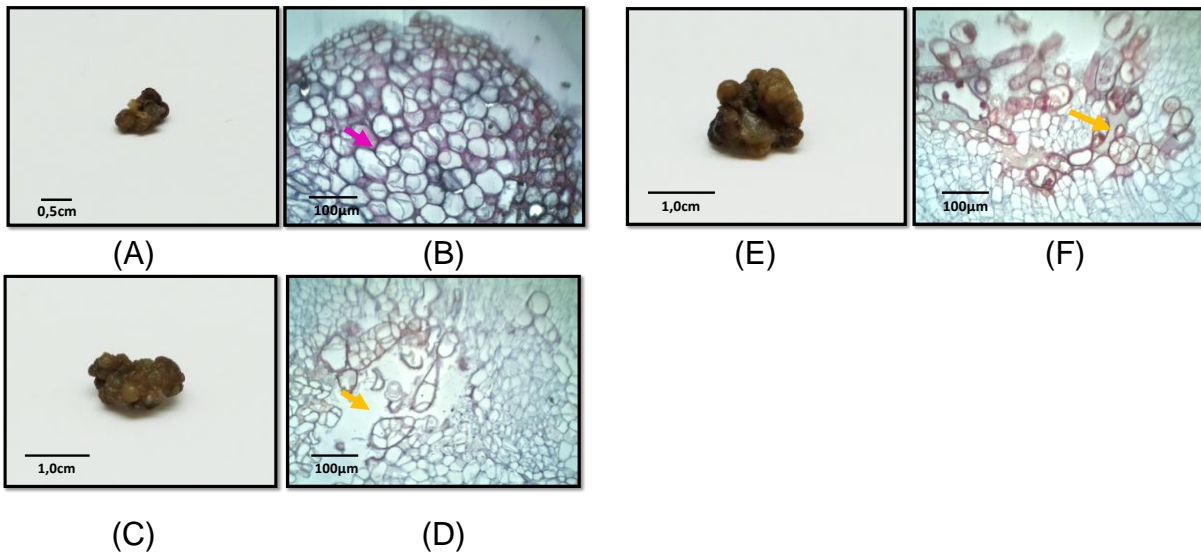


Figura 20 - Respostas positivas para o tratamento com zeatina em associação com ANA foram encontradas somente nos calos induzidos em T14. As divisões assimétricas e polarizadas (seta laranjada) foram encontradas somente em calos originados de epicótilo, e induzidos no tratamento T14, passando por pulse de 24 horas (F) ou 48 horas (D). Células dos calos que se encontravam em morte celular programada (seta rosa), representado pela retração da membrana plasmática (B), representam calos originados de hipocótilos e induzidos em T14, e tratados com pulse de 24 horas

A falta de resposta encontradas para citocinina zeatina, também foi verificado por George (1993) que constatou em gérbera que as citocininas zeatina e 2ip podem apresentar inatividade por serem rapidamente degradadas pela ação da enzima natural citocinina oxidase, pela quebra da dupla ligação da cadeia lateral da molécula. Esse fato poderia explicar os baixos índices de multiplicação alcançados nos tratamentos com estas citocininas.

Krikorian (1991) ainda comenta que o BAP tem sido mais utilizado atualmente que as citocininas cinetina e zeatina por ser um composto mais ativo, e cita que as adenilcitocininas (zeatina e cinetina) somente apresentaram atividade na presença de uma auxina, como o AIA, por exemplo, em pesquisas com cenoura e medula de tabaco. Contudo, mesmo com a adição de auxina, os calos de teca não apresentaram resposta satisfatória.

A presença da zeatina em cultura em suspensão de cenoura, observado por Ammirato (1976), em concentrações  $0,01\mu\text{M}$  a  $1\mu\text{M}$  promoveu o crescimento de embriões somáticos, porém perturbou os aspectos normais de desenvolvimento, gerando altos níveis de aberrações nos embriões. Um maneira citada pelo autor de controlar tal anormalidade é o uso de zeatina em conjunto com ABA.

#### 4.6 Indução e maturação com glutamina

Finalizando os testes para indução da embriogênese somática, foi realizado experimento utilizando glutamina. Foram feitos dois tratamentos, ambos contendo tal aminoácido, porém foram utilizados meio de culturas líquido e semi-sólido.

Calos provenientes de cultivo em meio líquido apresentaram coloração escura, devido ao processo de oxidação, variando de amarelo escuro a marrom escuro. Quanto a estrutura estes eram pequenos, no máximo 1,0cm de comprimento, além de serem formados por tecido compacto porém de fácil desestruturação.

Assim como nas demais etapas foram encontradas estruturas com características de pró-embriões, contudo, embora tivessem um padrão de divisão celular assimétrico e polarizado, além de serem circundado por mucilagem, estas estruturas continuaram a ser enviáveis (Figuras 21F, 21H e 21L). Ainda se tratando dessas estruturas foi possível visualizar a presença de compostos fenólicos dentro das células (Figura 21H). Além disso, grande parte do tecido dos calos analisados continuavam em processo de morte celular, com degeneração do núcleo e retração da membrana citoplasmática (Figuras 21B, 21D e 21J).

Com pouca resposta observada, o tratamento em meio semi-sólido não apresentou evolução. Tendo com resposta calos com células típicas, alongadas e vacuoladas, porém já em estágio de morte celular. Ainda com pouca frequência foram encontradas estruturas pró-embriogênicas, com divisão celular característica, porém inviáveis (Figuras 22B e 22D).

Embora estas estruturas pró-embriogênicas encontradas a partir da fase de manutenção dos calos apresentassem pouco conteúdo proteico no citoplasma, isso não significa que eles não tenham nenhum sucesso em sua evolução, pois, em calos provenientes de cotilédones de *Pinus strobus* o rápido colapso no estoque de proteínas coincide com o início da determinação celular nos calos, e podem refletir em uma mudança metabólica nos explantes (FLINN et al., 1989). Em cultura de calos de *Acca sellowiana*, estudada por Inocente et al. (2009), com o passar do tempo as culturas embriogênicas apresentavam baixos níveis de proteínas. A diminuição das proteínas no tecido e a obtenção de estruturas pró-embriônicas foram observadas concomitantemente durante a indução da embriogênese somática. Estas taxas de proteínas só foram aumentar nos embriões somáticos de acordo com a progressão dos estágios de desenvolvimento.

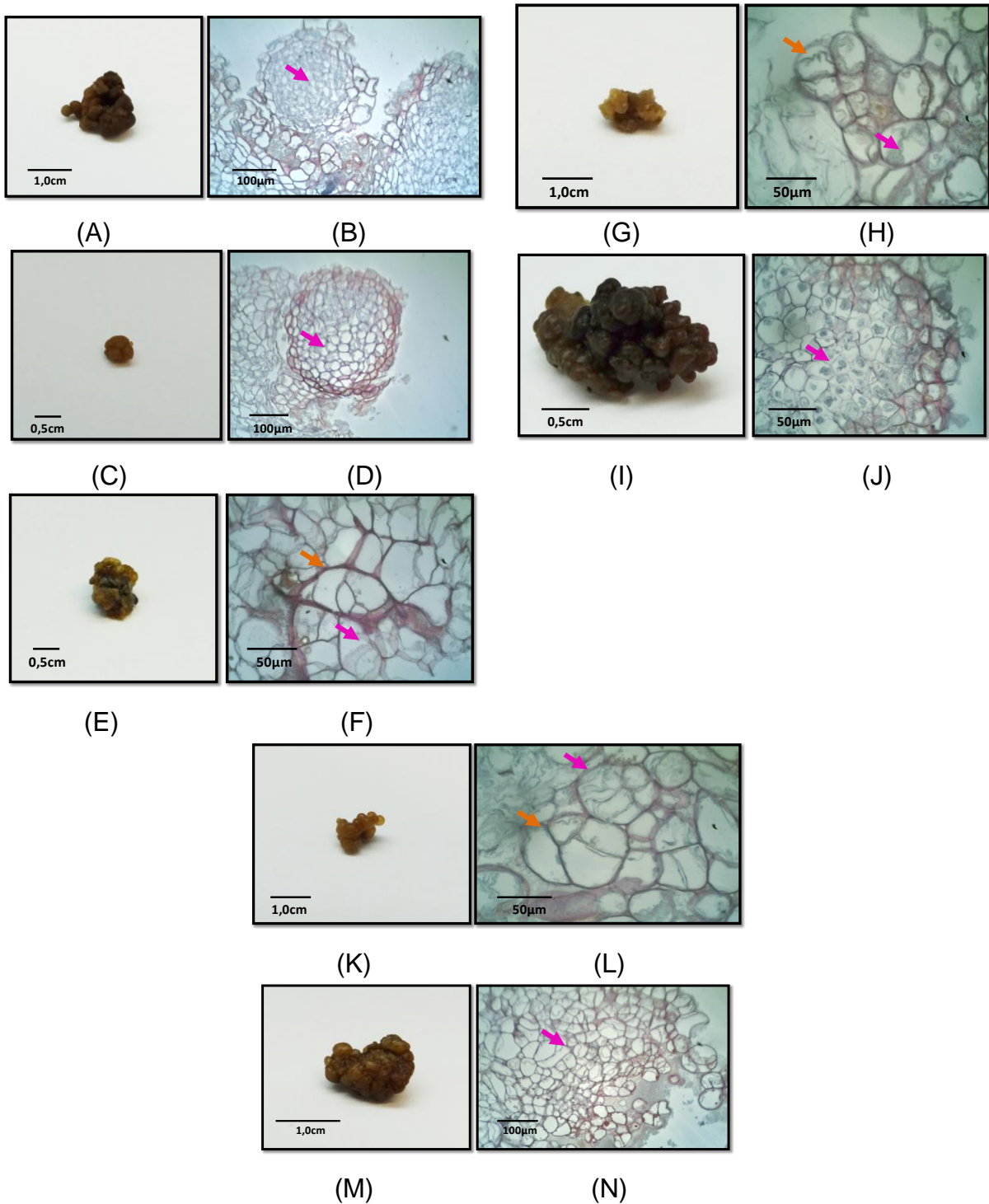


Figura 21 - Figuras representando os resultados obtidos em meio líquido contendo glutamina. os calos provenientes de indução em meio T14, passados por pulso de 48 horas e originários de hipocótilo (E e F) e epicótilo (K e L) ainda apresentavam estruturas pró embriogênicas (seta laranjada) em processo de morte celular (seta rosa), bem como os calos induzidos em T13, com controle da rizogênese em meio acrescido com BAP, passados por pulso de 24 horas (G e H). Os demais calos eram constituídos de células de característica típicas, em processo de morte celular. Como é o caso dos calos originados de cotilédone (A e B) e epicótilo (C e D) induzidos pelo tratamento T14, e passados pelo pulso de 48 horas. Os calos induzidos a partir de explantes de hipocótilo em T13 e T14 passados respectivamente por pulso de 48 horas (I e J) e de 24 horas (M e N) apenas apresentaram morte celular. Bem como os calos originados de cotilédones em T14 e induzidos em pulso de 48 horas (A e B)



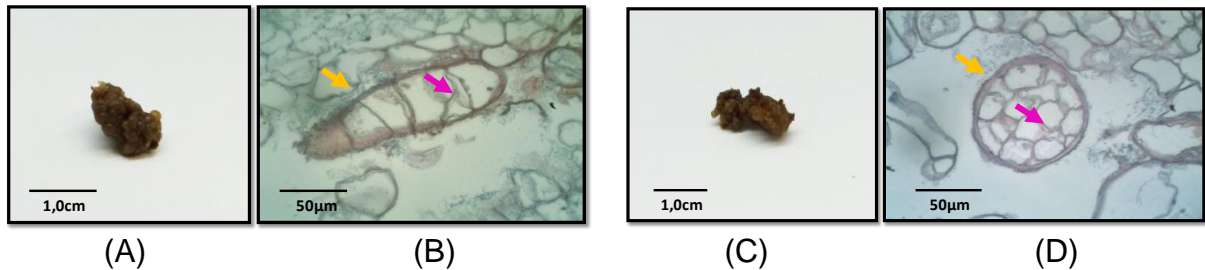


Figura 22 - Explantes mais responsivos para meio sólido contendo glutamina. Ambos são provenientes de calos originários de epicótilo, induzidos com T14, com 24 horas de indução em TDZ (C e D), e em 48 horas (A e B). Ambos apresentam estruturas pró-embriogênicas inviáveis (seta laranjada) devido ao processo de morte celular (seta rosa)

Contudo, os pró-embriões estavam presentes nos tecidos, porém os estímulos não causaram efeito benéfico para que tais estruturas se desenvolvessem, tendo os tecidos dos calos permanecidos em processo de morte celular.

Considerando a falta de evolução do material, dentre todo material testado, os calos provenientes dos calos induzidos em T13 originários de epicótilos foram os mais responsivos.

A glutamina é comumente empregada como fonte de nitrogênio orgânico em meios de cultura de tecido de plantas superiores (Franklin e Dixon, 1994), sendo que vários pesquisadores demonstraram o envolvimento benéfico da suplementação do meio de cultura com esse aminoácido. Entretanto, poucas são as hipóteses de como esse aminoácido agiria.

Em trabalho realizado com indução da embriogênese somática em algodão, Carvalho et al. (1998) observou que calos quando cultivados em meio de cultura contendo glutamina apresentaram formação de embrióides. Price e Smith (1979) trabalhando com *G. Klotzschianum*, comprovaram a formação de embriões somáticos a partir de suspensões celulares depois de 3 a 4 semanas em meio que continha glutamina, entretanto, não conseguiram regenerar plantas. Mesmo sem a obtenção de plantas, Price e Smith tiveram a obtenção de embriões, diferentemente do encontrado nos calos de teca.

Hamasaki et al. (2005) observaram que a organogênese adventícia em folhas de abacaxizeiro foi muito estimulada na presença de glutamina no meio de cultura, passando de 40% para 70%. Vasudevan et al. (2004) mostraram que o tratamento com glutamina induziu um maior crescimento de explantes (ápice caulinar) e maior número de brotos por explante de pepino (*Cucumis sativus*), em

relação aos explantes cultivados com outras fontes de nitrogênio. Segundo Gamborg (1970), o aumento da taxa de crescimento de células em suspensão de *Glicine max* (soja), pela adição de glutamina ao meio, poderia ser explicado pelo fato de que esse aminoácido proporcionou uma fonte de nitrogênio prontamente disponível.

Resultados referentes ao uso de glutamina em associação com outras fontes de nitrogênio em cultivo de calos de pau-brasil, foram mostrados por Wemer et al. (2010). Sendo a utilização da glutamina junto à adição de  $\text{KNO}_3$  bastante eficaz na promoção da divisão celular, contudo não obtiveram nenhuma resposta morfogênica. No entanto, Wemer et al. (2009) discutem que a falta de formação de embriões somáticos ou a falta de sinais de expressão para outro alvo morfogênico não significa que necessariamente as células dos calos de pau-brasil não tenham entrado na fase de determinação celular. Pois, nem sempre a divisão celular resulta diretamente em um embrião, mas sim em massas pró-embriogênicas as quais apenas algumas irão se desenvolver em embriões.

Altas concentrações de glutamina no meio de cultura aumentaram a proliferação de tecidos embriogênicos de *Cryptomeria japonica*, sugerindo-se que o tratamento com glutamina teria aumentado a síntese de macromoléculas ou metabólitos essenciais à manutenção da competência das células à embriogênese (Ogita et al., 2001).

Assim como nos calos de teca, o acúmulo de compostos fenólicos nos calos de pau-brasil foi expressivo, segundo Wemer et al. (2010). E segundo Preece et al. (2008) a ação oxidativa de compostos fenólicos constitui um fator limitante no crescimento das culturas *in vitro*. E embora os calos de teca não tenham passado por análise quantitativa de fenóis, os resultados sugerem que o acúmulo destes compostos seja um dos fatores limitantes da determinação celular para um rota morfogênica específica.

#### **4.7 Morte celular programada**

A morte celular esteve presente em quase todos os tecidos dos calos de teca a partir do momento em que foi realizado o experimento com pulse em TDZ. Para tanto, esse processo é encontrado no processo de desenvolvimento da embriogênese somática, podendo não representar uma resposta ruim, e sim um resultado do padrão de formação dos embriões.

Comparado com o citoplasma de células vivas, o citoplasma de células mortas são condensados e contraídos. Em algumas células mortas, o citoplasma é quebrado em pequenos fragmentos de membranas, o qual sugere que a morte celular programada ocorreu de forma similar a apoptose (HAVEEL e DURZAN, 1996; MCCABE et al., 1997).

Segundo Pennell e Lamb (1997), a condensação e retração do citoplasma, e a fragmentação do DNA implica que as culturas embriogênicas morrem por morte celular programada e não por necrose, como encontrado nos calos de teca. Tal conclusão é reforçada pela análise de células de cenoura que foram mortas por altas temperaturas. A morte dessas células envolveram dilatação, lise e rápido colapso do DNA, mas sem a formação de fragmentos (MCCABE et al., 1997).

É possível que muitas das células em cultivo entrem em morte celular porque não possuem função. Algumas células que morrem podem ser equivalente às células basais que se desenvolvem em suspensor durante a embriogênese zigótica, e podem morrer porque não possuem função na embriogênese somática. Entretanto, a morte celular é uma característica regular nos tecidos nos quais se originam embriões apomíticos (HABERLANDT, 1902). Portanto, também é possível que a morte celular programada tenha uma função na embriogênese somática, por exemplo, células em morte podem de alguma maneira mandar sinais para outras células se desenvolverem em embriões.

A formação de massas pró-embriogênicas é bem conhecida como um fenômeno do desenvolvimento que constitui um estágio de transição durante a embriogênese somática, e representa um mecanismo de manutenção do potencial embriogênico em presença de auxina, ou balanços auxina/citocinina (HALPERIN e WETHERELL, 1965; DE VRIES et al., 1988; MCCABE et al., 1997; FILONOVA et al., 2000).

Assim como encontrado nos calos de teca, as massas pró-embriogênicas de uma espécie de conífera norueguesa podem passar por dois processos. O primeiro deles é a multiplicação de tais estruturas na presença de auxina e citocinina, e a segunda, a transdiferenciação em embriões na ausência de reguladores de crescimento, sendo o último processo acompanhado de massiva morte celular programada nas massas pró-embriogênicas (FILONOVA et al., 2000).

A embriogênese somática na espécie da Noruega envolve duas formas de morte celular programada, as quais são responsáveis pela degradação das massas



pró-embriogênicas e pela eliminação dos suspensores. Estes dois eventos representam respectivamente, morte celular comum na progressão da embriogênese somática (transição destas massas em embriões) e, o padrão de formação embriogênico (FILANOVA et al., 2000).

Assim como encontrado nos calos de teca no presente trabalho, Yakovlev e Yoffe (1957) e Cave et al. (1961) encontraram respostas similares para *Paeonia spp.*, na fase de multiplicação e maturação dos pró-embriões em embriões as células se tornavam vacuoladas e por fim entravam em colapso.

#### **4.9 Considerações finais**

Durante toda a execução do experimento foram encontradas algumas dificuldades. A primeira delas foi a obtenção do número de explantes necessários para se iniciar o processo de indução, uma vez que as sementes de teca possuem uma taxa de germinação muito baixa, mesmo no cultivo *in vitro*. Seguindo da obtenção dos explantes necessários, houve muita perda de material pela manifestação de micro-organismos endofíticos.

Para as análises histológica e histoquímica foram feitos alguns ajustes nos protocolos de fixação e emblocagem do material, uma vez que se tratavam de calos. Embora tais ajustes tenham melhorado a eficiência do processo, ainda é possível realizar outras adaptações.

Com o término de todos os experimentos a obtenção de embriões somáticos não foi eficaz. Para tanto, a pesquisa da indução da embriogênese somática em teca se mostra promissora, desde que novos testes e alguns ajustes sejam realizados a partir do presente trabalho.

Quanto a indução de calos, o picloram e o BAP mostraram eficientes para calogênese dos explantes da espécie. Porém, como apresentado nos resultados e na discussão, tais calos não eram embriogênicos e, novos testes podem ser realizados usando outras auxinas, e mesmo apenas o uso do picloram sem adição de citocininas.

Como apresentado, o BAP apresentou boa resposta no controle da rizogênese na concentração utilizada.

Na fase de manutenção dos calos, os quais foram cultivados no meio original de indução, estes não apresentaram nenhuma evolução em relação a obtenção dos embriões, novos experimentos podem ser realizados testando outros

fitorreguladores, bem como o balanço daqueles já usados neste trabalho (picloram e BAP).

O uso do pulse com TDZ se mostrou promissor na obtenção de estruturas pró-embriogênicas, contudo estas não evoluíram nas fases em sequência. Desta forma, novos tratamentos podem ser testados, como o aumento da concentração da citocinina e o tempo de exposição dos calos ao pulse.

Ainda presentes no experimento com zeatina, as estruturas pró-embriogênicas não se desenvolveram. Estudos com tal fonte de citocinina é pouco estudado para indução da embriogênese hoje em dia, uma alternativa para realizar a maturação dos pró-embriões seria testes com ABA.

Também a glutamina, aminoácido utilizado para maturação de embriões somáticos em algumas espécies, não foi capaz de maturar as estruturas pró-embriogênicas, logo, novos testes podem ser realizados, como o uso da glutamina em associação a diferentes fontes de nitrogênio, bem como testar concentrações diferentes a serem acrescentadas ao meio de cultura.

Em síntese, o trabalho mostra algumas resposta quanto a obtenção de pró-embriões e, auxilia na montagem de novos experimentos para se obter a maturação de tais estruturas e, por fim, resultar em embriões somáticos.



## 5 CONCLUSÕES

- 1) O uso de picloram em conjunto com BAP foi adequado para obtenção de calos para os três tipos de explantes testados (epicótilo, cotilédone e hipocótilo) quando usados os balanços  $1,5/1,0\text{mgL}^{-1}$  e  $1,5/4,0\text{mgL}^{-1}$  (auxina/citocinina).
- 2) A citocinina BAP promoveu o controle da rizogênese nos calos de teca em concentração  $1,0\text{mgL}^{-1}$ .
- 3) A técnica de pulse com TDZ apresentou resultados positivos para produção de estruturas pró-embriogênicas.
- 4) O uso de zeatina e glutamina, da maneira como foram testadas, não tiveram atuação esperada no desenvolvimento e maturação das estruturas pró-embriogênicas.
- 5) Pelos resultados obtidos, o explante mais responsivo foi o epicótilo, seguido do cotilédone e, então, hipocótilo.
- 6) As análises histológica e histoquímica utilizadas para análise dos tecidos dos calos durante todo o processo de indução foram eficientes.
- 7) A ausência do desenvolvimento dos pró-embriões e, o processo de morte celular encontrados nos tecidos dos calos não representam um resultado negativo, sendo tais eventos recorrentes na embriogênese somática.
- 8) Com a término do trabalho vê-se a necessidade de novos testes para aprimorar a obtenção das estruturas pró-embriogênicas, bem como encontrar o estímulo correto para o desenvolvimento das mesmas.



## REFERÊNCIAS

- ABDELNOUR, A.; MUNOZ, A. Micropropagación de teca (*Tectona grandis*). **Kurú: Revista Forestal**, San José, v. 2, n. 5, p.1-11, 2005.
- AHMED, A.B.A.; RAO, A.S.; RAO, M.V.; TAHA, M. Effect of picloram, additives and plant growth regulators on somatic embryogenesis of *Phyllanthus nodiflorus* (L.) Greene. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 1, p. 7-13, 2011.
- AKASAKA, Y.; DAIMON H.; MII, M. Improved plant regeneration from cultured leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron. **Plant Science**, Amsterdam, v. 156, p. 169-175, 2000.
- AKRAM, M.; AFTAB, F. An efficient method for clonal propagation and *in vitro* establishment of softwood shoots from epicormic buds of teak (*Tectona grandis* L.). **Forestry Studies in China**, Beijing, v. 11, n. 2, p. 105-110, 2009.
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C.V.; GRANER, E.M.; BRONDANI, G.E.; ABREU-TARAZI, M.F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 31, n. 8, p. 1495-1515, 2012.
- AMMIRATO, P.V. Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 579-586, 1977.
- ANDRADE, W. F. **Indução do rejuvenescimento de teca (*Tectona grandis* L. f) através de enxertia seriada e micropropagação**. 2010. 75 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ANTONY, J.M.; SENARATNA, T.; DIXON,; SIVASITHAMPARAM, K. Somatic embryogenesis for mass propagation of Ericaceae a case study with *Leucopogon verticillatus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 76, p. 137-146, 2004.
- ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V.S. Synthetic seed: prospects and limitations. **Current Science**, Bangalore, v. 78, n. 12, p. 1438- 1444, 2000.
- ASMAH, H.N.; HASNIDA, H.N.; ZAIMAH, N.A.N.; NORALIZA, A.; SALMI, N.N. Synthetic seed technology for encapsulation and regrowth of *in vitro*-derived *Acacia hybrid* shoot and axillary buds. **African Journal Biotechnology**, Nigéria, v. 10, n. 40, p. 7820-7824, 2011.
- BAGHEL, R.S.; TIWARI, S.; TRIPATHI, M.K. Comparison of morphogenic and plant regeneration ability of some explants of teak (*Tectona grandis* Linn. F). **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 4, n. 2, p. 125-136, 2008.
- BARCIELA, J.; VIEITEZ, A.M. Anatomical sequence and morphometric analysis during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L. **Annals of Botany**, Santiago de Compostela, v. 71, p. 395-404, 1993.

BEDNAR, E.M.L.; BEDNAR, T.W. Light and hormonal control of root formation in *Zea mays* callus cultures. **Development, Growth and Differentiation**, Tokyo, v. 14, n. 2, p. 1-10, 1972.

BENEDITO, V. A.; FILHO, F.A.A.M.; MENDES, B.M.J. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos em variedades de laranja doce. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 1, p. 33-38, 2000.

BENNETT, I.J.; McDAVID, D.A.; McCOMB, J.A. The influence of ammonium nitrate, pH and indole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus globulos*. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 3, p. 355-360, 2003.

BONGA, J.M. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Tissue culture in forestry**. Boston: Martinus Nijhoff, Dr W Junk Publishers, 1993. p.387-412.

BROSSARD, D. Root organogenesis from foliar discs of *Crepis capillars* L. Wallr. cultured *in vitro*: cytochemical and micro-spectrophotometric analysis. **The New Phytologist**, Lancaster, v. 79, p. 423-429, 1977.

BURRELL, A.M.; LINEBERGER, R.D.; RATHORE, K.S.; BYRNE, D.H. Genetic variation in somatic embryogenesis of rose. **HortScience**, Alexandria, v. 41, p. 1165-1168, 2006.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; MALDONADO, S.B.; GUERRA, M.P. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca Sellowiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 217-224, 2009.

CAO, J.; JIANG, F.; SODMERGEN; CUI, K. Time-course of programmed cell death during leaf senescence in *Eucommia ulmoides*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 116, n. 1, p. 7-12, 2003.

CARVALHO, J.M.F.C.; BENITO, E.G.; PEREZ, C.; SANTOS, J.W. Resposta de deus cultivares de algodão à embriogênese somática em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Oleagenosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 2, n. 1, p. 13-19, 1998.

CAVE, M.S.; ARNOTT, H.J.; COOK, S.A. Embryogeny in the California peonies with reference to their taxonomic position. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 48, p. 397-404, 1961.

CHALUPA, V. European hardwoods. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**, Dordrecht, v. 3, p. 224-240, 1987.

- CHALUPA, V. Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp.). In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. v. 5, p. 31-43.
- CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; CHEVALIER, C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 581-588, 2006.
- DAQUINTA, M.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; ESCALONA, M. Morfogénesis in vitro de teca (*Tectona grandis* L). **Investigación agraria: Sistemas y recursos forestales**, Madrid, v. 11, n. 1, p. 137-144, 2002.
- DAQUINTA, M.; RAMOS, L.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; TRINA, D. ESCALONA, M. Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.f.). Comunicación técnica. **Revista Forestal Centroamericana**, Turrialba, v.35, p.25-28, 2000.
- DAQUINTA, M.; RAMOS, L.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; TRINA, D.; ESCALONA, M. Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.f.). **Revista Forestal Centroamericana**, Turrialba, v. 35, p. 25-28, 2001.
- DENCHEV, P.D.; CONGER, B.V. *In vitro* culture of switchgrass: influence of 2,4-D e picloram in combination with benzyladenine on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 40, p. 43-48, 1995.
- DEVI, Y.S.; MUKHERJEE, B.B.; GUPTA, S. Rapid cloning of elite teak (*Tectona grandis* Linn.) by in vitro multiple shoot production. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.32, p.668-671, 1994.
- DE VRIES, S. C.; BOOIJ, H.; MEYERINK, P.; HUISMAN, G.; WILDE, H.D.; THOMAS, T.L.; VAN KAMMEN, A. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. **Planta**, Berlin, v. 176, p. 196-204, 1988.
- DOMINGUEZ, F.; MORENO, J.; CEJUDO, F.J. A gibberellin-induced nuclease is localized in the nucleus of wheat aleurone cells undergoing programmed cell death. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 12, p. 11530-11536, 2004.
- DRAKE, P.M.W.; JOHN, A.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Cytokinin pulse-mediated shoot organogenesis from cotyledons of Sitka Spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] and high frequency in vitro rooting of shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 50, p. 147-151, 1997.
- DURZAN, D.J.; CHALUPA, V. Growth and metabolism of cells and tissue of jack pine (*Pinus banksiana* ). III. Growth of cells in liquid suspension cultures in light and darkness. **Canadian Journal of Botany**, Ontario, v. 54, p. 456-467, 1976.



DURZAN, D.J. Progress and promise in forest genetics. Anniversary Conference, 50., 1980. **Proceedings...** Appleton, The Cutting : Paper Science and Technology Edge, May 8–10, Appleton, p. 31-60, 1980.

DURZAN, D.J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology Genetics Engineering Review**, London, v. 6, p. 339-376, 1988.

ENTERS, T. Site, technology and productivity of teak plantations in Southeast Asia. **Unasyiva**, Roma, v.51, p.61, 2000.

EYMAR, E.; ALEGRE, J.; TORIBIO, M.; VELA-LÓPEZ, D. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, p. 57-65, 2000.

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

FILONOVA, L.H.; BOZHKOVA, P.V.; BRUKHIN, V.B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; VON ARNOLD, S. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, p. 4399-4411, 2000.

FINER, J.J. Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.7, p. 399-402, 1988.

FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 16, n. 1, p. 92-96, 1968.

FLINN, B.S.; WEBB, D.T.; NEWCOMB, W. Morphometric analysis of reserve substances and ultrastructural changes during caulogenic determination and loss of competence of Eastern White pine (*Pinus strobus*) cotyledons *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Ontario, v. 67, p. 779-789, 1989.

FLYGH, G.; GRÖNROOS, R.; ARNOLD, S.von. Induction, rooting and growth of adventitious shoots of *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Forest Research**, Clemson, v. 23, p. 1907-1916, 1993.

FRANKLIN, C.I.; DIXON, R.A. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: DIXON, R.A.; GONZALES, R.A. (Ed.). **Plant Cell Culture – A practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1994. p. 1-25.

FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **Plant Physiology**, Rochville, v. 64, p. 162-164, 1979.

FURTADO, M.B. **Indução e controle da embriogênese somática em *O. catharinensis* e *O. odorifera* (Lauraceae)**. 2010. 64p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 4, p. 181-187, 2004.

GANGOPADHYAY, G.; BASU, G.; PODDAR, R.; GUPTA, S.; MUKHRJEE, K.K. Micropropagation of *Tectona grandis*: assessment of genetic fidelity. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 46, n. 3, p. 459-461, 2003.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 1993. e.2, v.2.

GERA, M.; GERA, N.; SINCH, V.K. Rooting response of root cuttings of some mpt species under low cost mist conditions. **Indian Forester**, DehraDun, v.126, p.171-174, 2000.

GRANER, E.M. **Avaliação histocitológica, histoquímica e morfofisiológica da habituação e senescência em pupunheiras mantidas *in vitro***. 2013. 197 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GRANER, E.M.; OBERSCHELP, G.P.J.; BRONDANI, G.E.; BATAGIN-PIOTTO, K.D.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. TDZ pulsing evaluation on the in vitro morphogenesis of peach palm. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Lucknow, v. 19, n. 2, p. 283-288, 2013.

GREENWOOD, M.S. Juvenility and maturation in conifers. current concepts. **Tree Physiology**, Victoria, v. 15, p. 433-438, 1995.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: \_\_\_\_\_ **Culturas de tecidos e transformação genética em plantas**. Brasília: Embrapa-CBAB, 1999. v. 2, p. 533-568.

GUPTA, P.K.;NADGIR, A.L.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANNATHAN, V. Tissue culture of Forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.17, p.259-268, 1980.

GYVES, E.M.; RUGINI J.I.E. Efficient method of micropropagation and in vitro rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large-scale industrial plantations. **Annual Forest Science**, Nancy, v. 64, p.73-78, 2007.

HABERER, G.; KIEBER, J.J. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. **Plant Physiology**, Rochville, v. 128 p. 354-362, 2002.

HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **S.B. Weisen Wien Mathnaturw**, Wien, v. 111, p. 69-92, 1902.

HACKETT, WP. Juvenility and maturity. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1987. p. 216-148.

HAKMAN, I.; FOWKE, L.C.; VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). **Plant Science**, Amsterdam, v. 38, p. 53–59, 1985.

HALPERIN, W.; WETHERELL, D.F. Ontogeny of adventive embryos of wild carrot. **Science**, Washington, v. 147, p. 756-758, 1965.

HAMASAKI, R.M.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 17, p. 273-281, 2005.

HAVEL, L.; DURZAN, D.J. Apoptosis during diploid parthenogenesis and early somatic embryogenesis of Norway spruce. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 157, p. 8-16, 1996.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L. de A.; GONÇALVES, A.N. Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de Eucalyptus. Piracicaba: IPEF, 2002. 21p. (IPEF Circular Técnica, 194).

HU, C.Y.; SUSSEX, I.M. *In vitro* development of embryoids on cotyledons of *Ilex aquifolium*. **Phytomorphology**, Delhi, v.21, p.103-107, 1971.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** Dordrecht, v. 33, p. 105-119, 1993.

HUTCHINSON, M.J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P.K. Morphological and physiological changes during thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 157, n. 4, p. 440-446, 1996.

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

JONES, M.P.A.; CAO, J.; O'BRIEN, R.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 26, p. 1481-1490, 2007.

JOSHI, M.; SUJATHA, K.; HAZRA, S. Effect os TDZ and 2,4D on peanut somatic embryogenesis and *in vitro* bud development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 94, n. 1, p. 85-90, 2008.

KAOSA ard, A.; SUANGTHO, V.; KJAER, E.D. Experience from tree improvement of teak (*Tectona grandis*) in Thailand. **Technical Note Danida Forest Seed Centre**. Denmark, Hoersholm, v.50, 8p, 1998.

KAOUTHER, B.M.; NADHRA, E.; AHLEM, C.; JEMMALI, A.; DRUART, P. *In vitro* picloram-induced somatic embryogenesis from leaflets of cherry (*Prunus incisa* Thunb.). **Journal of Life Sciences**, New Delhi, v. 5, p. 913-920, 2011.

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

KAUR, P.; KOTHARI, S. L. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, p. 73-79, 2004.

KEOGH, R.M. **The care and management of Teak (*Tectona grandis* L.f.) plantations**. Dublin, 1987. 48p.

KITAKAWA, A.Y. **Quantificação de aminoácidos livres endógenos durante a indução da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro**. 2004. 90 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

KOLLERT, W.; CHERUBINI, L. Teak Resources and Market Assessment 2010 (*Tectona grandis* Linn. F.). **FAO - Planted forests and trees working paper series**, Rome, 2012. p. 1-42.

KORDESTANI, G.K.; KARAMI, O. Picloram-induced somatic embryogenesis in leaves of strawberry (*Fragaria ananassa* L.). **Acta Biologica Cracoviensia**, Cracow, v. 50, n. 1, p. 69-72, 2008.

KOVAC, J. Micropropagation of *Actinidia kolomikta*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 35, p. 301-303, 1993.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.R.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**, Cali, 1991. p.41-78.

KUMAR, A. Teak seed improvement – achievements and problems. **India Forester**, Dehra Dun, v.118, p.525-533, 1992.

KUO, C.C. ; ZURA KOWSKI, K.V. CARLSON, K. ; FILNER, P. ; WANG, A. Plant regeneration from root-derived callus of *Gossypium hirsutum* L. In: BELTWISE COTTON PRODUCTS RESEARCH CONFERENCE, 1989, Memphis. **Proceedings**, Memphis: National Cotton Council, 1989. p.638- 640.

KUSHALKAR, R.; SHARON, M. Direct and indirect somatic embryogenesis in teak (*Tectona grandis* L.). **Current Science**, Bangalore, v. 71, n.9, p.712-715, 1996.

LAPLAZE, L.; BENKOVA, E.; CASIMIRO, I.; MAES, L.; VANNESTE, S.; SWARUP, R.; WEIJERS, D.; CALVO, V.; PARIZOT, B.; RODRIGUEZ, M.B.H.; OFFRINGA, R.; GRAHAM, N.; DOUMAS, P.; FRIML, J.; BOGUSZ, D.; BEECKMAN, T.; BENNET, M. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 19, p. 3889-3900, 2007.

LIM, Z.X.; LING, A.P.K.; HUSSEIN, S. Callus induction of *Ocimum sanctum* and estimation of its total flavonoids content. **Asian Journal of Agricultural Sciences**, Faisalabad, v. 1, n. 2, p. 55-91, 2009.

LINGHT, M.E.; GARDNER, M.J.; JÄGER, A.K.; STADEN, van. Dual regulation of seed germination by smoke solutions. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 37, p. 135-141, 2002.

LITTLE, E.L.; MAGBANUA, Z.V.; PARROTT, W.A. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 351-357, 2000.

LITZ, R.E.; CHAVEZ, V.C.; MOON, P.A. Induction of embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination. In: MANTELL, S.H.; BRUNS, S.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. (Ed.). Recent advances in biotechnology for conservation and management. **International Foundation for Science**, Stockholm, 1998. p. 232-243,

MACEDO, R.L.G.; GOMES, J.E.; VENTURIN, N.; SALGADO, B.G. Desenvolvimento inicial de *Tectona grandis* L. f. (Teca) em diferentes espaçamentos no município de Paracatu, MG. **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 1, p. 61-69, jan/mar. 2005.

MARGARA, J. Bases de la multiplicación vegetativa. Les méristèmes et l'organogénese. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1982. p. 157-212.

MATAND, P. Evaluation of peanut genotypes for in vitro plant regeneration using thidiazuron. **Journal of Biotechnology**, Berlin, v. 130, p. 202-207, 2007.

MATRICARDI, W.A.T. **Efeito dos fatores do solo sobre o desenvolvimento de teca (*Tectona grandis* L. F.) cultivada na grande Cáceres - Mato Grosso**. 1988. 78 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MATHUR, G.; NADGAUDA, R. *In vitro* plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus wallichiana* A. B. Jacks. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, p.74-80, 1999.

MAXWELL P.; JONES A.; YI Z., MURCH S.J.; SAXENA P.K. Thidiazuron induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: micropropagation in solid and liquid culture systems. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.26, p. 13-19, 2007.

MERKLE, S.A.; BAILEY, R.L.; PAULEY, B.A.; NEU, K.A.; KIM, M.K.; RUGH, C.L.; MONTELLO, P.M. Somatic embryogenesis from tissues of mature sweetgum trees. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 27, p. 959-964, 1997.

MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Cytokinin metabolism and action. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 89-118, 2001.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phrnylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, Alexandria, v.22, n. 6, p. 1194-1197, 1987.

MONTAGNINI, F. Plantaciones forestales con especies nativas: una alternativa para la producción de madera y la provisión de servicios ambientales. **Recursos Naturales y Ambiente**, Valdivia, v. 43, p. 28-35, 2004.

MONTEUUIS, O.; BON, M-C.; GOH, D.K.S. Teak propagation by in vitro culture. **Bois et Forêts des Tropiques**, Nogent-sur-Marne, v. 256, p.43-53, 1998.

MUMINOVA, M.; NASRETDINOVA, M.; JATAEV, S.D.; ABDUKARIMOV, A. Somatic embryogenesis from callus cultures of Teak (*Tectona grandis* L.f.) derived from leaf explants. **Journal of Plant Sciences**, Faisalabad, v. 2, p. 184-187, 1999.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron-induced somatic embryo genesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, p. 268–276, 1995.

NAUTIYAL, S.; SINGH, U.; GURUMURTI, K. Rooting response of branch cuttings of teak (*Tectona grandis*) as influenced by season and growth hormones. **Indian Forester**, Dehradun, v. 117, n. 4, p. 249-255, 1991.

OGITA, S.; SASAMOTO, H.; YEUNG, E. C. THORPE, T. A. The effects of glutamine on the maintenance of embryogenic cultures of *Cryptomeria japonica*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology: Plant**, Wallingford, v. 37, p. 268-273, 2001.

OLIVEIRA, S.A.; MACHADO, M.F.P.S.; PRIOLI, A.J.; MANGOLIN, C.A. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **In vitro Cellular and Developmental Biology.**, Wallingford, v. 31, p. 47-50, 1995.

ÖTVÖS, K.; PASTERNAK, T.P.; MISKOLCZI, P.; DOMOKI, M.; DORJGOTOV, D.; SZÜCS, A.; BOTTKA, S.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. **The Plant Journal**, Warwick, v. 43, n. 6, p. 849-860, 2006.

PARK, S.Y.; YU, J.W.; PARK, J.S.; LI, J.; YOO, S.C.; LEE, N.Y.; LEE, S.K.; JEONG, S.W.; SEO, H.S.; KOH, H.J.; JEON, J.S.; PARK, Y. II; PAEK, N.C. The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. **Plant Cell**, Waterbury, v. 19, n. 5, p. 1649-1664, 2007.

PASTERNAK, T.P.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; VANONCKELEN, H. A.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, Rochville, v. 129, n. 4, p. 1807-1819, 2002.

PENNELL, R.I.; LAMB, C. Programmed cell death in plants. **Plant Cell**, Waterbury, v. 9, n. 7, p. 1157-1168, 1997.

PINKER, I.M. Chopper-light for shoot cultures. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 520, p. 195-202, 2002.

PINTO, G; VALENTIM, H.; COSTA, A.; CASTRO, S.; SANTOS, C. Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v. 38, p. 569-572, 2002.

PREECE, J. Plant physiological factors affecting growth and morphogenesis.. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DEKLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture**, Dordrecht, v. 3, p. 403-422, 2008.

PRICE, H.J. ; SMITH, R.H. Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzschianum* Andress. **Planta**, Berlin, v. 145, p. 305-307, 1979.

RAGHAVAN V. Can carrot and *Arabidopsis* serve as model systems to study the molecular biology of somatic embryogenesis? **Current Science**, Bangalore, v. 90, p. 1336-1343, 2006.

RAMESH, M.; UMATE, P.; VENUGOPAL RAO, K.; SADANANDAM, A. Micropropagation of *Terminalia bellirica* roxb. - A sericulture and medicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology: Plant**, Wallingford, v. 2, p. 184-187, 2005.

RANASINGHE, D.M.S.K.; BERLYN, G.M. Vegetative propagation of *Tectona grandis* (teak) by tissue culture. Forestry and Environment Symposium. Department of Forestry and Environmental Science, University of Sri Jayewardenepura, Sri Lanka , 1996. p. 34-35.

REDWAY, F.A. Histology and stereological analysis of shoot formation in leaf callus of *Saintpaulia ionantha* Wendl (African violet). **Plant Science**, Amsterdam, v. 73, p. 243-351, 1991.

REY, H.Y; BURTNIK, .; SANSBERRO, P.A.; MROGINSKI, L.A. Medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de explantos de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Turríalba**, San José, v. 41, n. 3 ,p. 306-310, 1991.

RUEDELL, C.M.; ALMEIDA, M.R.; SCHWAMBACH, J.; POSENATO, C.F.; FETTNETO, A.G. Pre and post-severance effects of light quality on carbohydrate dynamics and microcutting adventitious rooting of two *Eucalyptus* species of contrasting recalcitrance. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 69, n. 3, p. 235-245, 2013.

SANTIAGO, E.J.A.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; SANTANA, J.R.F.; GOMES, G.A. C. **Meios de cultura**: Cultura de tecidos. UFLA, Lavras, M.G.:Paiva e Paiva, 2001. p.3:22-35.

SANTOS, A.F.A.; ALMEIDA, B.C.; GAVA, F.H.; FAVARE, H.G.; FILHO, J.B.; COSTA, R.B.; BRONDANI, G.E. Clones production of *Tectona grandis*. **Advances in Forestry Science**, Cuiabá, v. 1, n. 2, p. 75-82, 2014.



SENER, O.; CAN, E.; ARSLAN, M.; CELIS, N. Effects of genotype and picloram concentrations on callus induction and plant regeneration from immature inflorescence of spring barley cultivars (*Hordeum Vulgare*). **Biotechnology e Biotechnological Equipment**, London, v. 22, n. 4, p. 915-920, 2014.

SHEKHAWAT, N.S.; RATHORE, T.S.; SINGH, R.P.; DEORA, N.S.; RAO, S.R. Factors affecting in vitro clonal propagation of *Prosopis cineraria*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, p. 273-280, 1993.

SHIRIN, F.; RANA, P.K.; MANDAL, A.K. *In vitro* micropropagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. **Journal of Forest Research**, Tokyo, v. 10, p. 465-469, 2005.

SHIRIN, F.; SARKAR, AK. Removal of phenolics exudates from explants of *Tectona grandis*. **Teaknet Newsletter**, Kerala, v. 30, p. 4–6, 2003.

SLATOR, N.J.; CALLISTER, A.N.; NICHOLS, J.D. Mechanical but not physical dormancy is a cause of poor germination in teak (*Tectona grandis* L.f.). **New Forests**, Dordrecht, v. 44, n. 1, p. 39-49, 2013.

SOUZA, A.I.A.F.; CONCEIÇÃO, H.E.O.; LEITE, D.R.R.; LIMA JUNIOR, A.C.; SILVA, R.A. Indução e manutenção de calos de timbó vermelho, uma planta multiuso. In: SEMINÁRIO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., ; SEMINÁRIO DE PESQUISA DA UFRA,2., 2010. Belém, 2010. 5 p.

SRIVASTAVA, K.; TIWARI, K.N.; SINGH, R.; SINGH, B.D.; JAISWAL, H.K. Shoot regeneration from immature cotyledons of *Cicer arietinum*. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 44, n. 3, p. 333-337, 2001.

STAMP, J.A. Somatic embryogenesis in cassava: The anatomy and morphology of the regeneration process. **Annals of Botany**, Santiago de Compostela, v. 59, p. 451-459, 1987.

SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A. Differential gene expression during somatic embryogenesis. In: MUJIB, A.; SAMAJ, J. Somatic embryogenesis. **Plant Cell Monographs**, Berlin, v. 2, p. 305–320, 2006.

TAMBARUSSI, E.V. **Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para micropropagação, regeneração e transformação genética de teca (*Tectona grandis* L. f.) visando resistência a *Hyblaea puera***. 2009. 122 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

TANIMOTO, S.; HARADA, H. Involvement of the accumulation of glutamine in the initiation of adventitious buds in stem segments of *Torenia*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 30, p. 541-547, 1999.



TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; REIS, G.G. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* w. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003.

TIWARI, S.K.; TIWARI, K.P.; SIRIL, E.A. An improved micropropagation protocol for teak. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, p. 1-6, 2002.

THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration in tissue culture. In: OWENS, L.D. **Genetic engineering: applications to agriculture**. Granada: Rowman and Allanheld Publishers, , 1987. p. 285-303.

THORPE, T.A.; MURASHIGE, T. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus culture. **Canadian Journal of Botany**, Ontário, v. 48, p. 277-285, 1970.

THORPE, T.A.; PATEL K.R. Clonal propagation: adventitious buds. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**, New York, v. 1, p. 49-58, 1984.

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

VASUDEVAN, A.; SELVARAJ, N.; GANAPATHI, A.; KASTHURIRENGAN, S.; RAMESH-ANBAZHAGAN, V.; MANICKAVASAGAM. Glutamine: a suitable nitrogen source for enhanced shoot multiplication in *Cucumis sativus* L. **Biologia Plantarum**, Heidelberg, v. 48, p. 125-128, 2004.

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**, Campinas, n.10, v.1, p.1-12, 1998.

VIET, L.F. Teca uma visão geral. **Revista da madeira**, São Paulo, v.5, n.30, p.24-26, 1996.

VIKRANT, R.A. Somatic embryogenesis or shoot formation following high 2,4 – D pulse treatment of mature embryos of *Paspalum scrobiculatum*. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 46, n. 2, p. 297-300, 2003.

VON ARNOLD, S.; BOZHKO, P.; CLAPHAM, D.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L.; HÖGBERG, K.A.; INGOUFF, M.; WIWEGER, M. Propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, p. 323-329, 2005.

VUOSKU, J.; SUTELA, S.; SAASKILAHTI, M.; KESTILA, J.; JOKELA, A.; SARJALA, T.; HAGGMAN, H. Dealing with the problem of non-specific *in situ* mRNA hybridization signals associated with plant tissues undergoing programmed cell death. **Plant Methods**, London, v. 7, n. 6, p. 1-25, 2010.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 187-194,

2001.

WERNER, E.T.; PESSOTTI, K.V.; LOPES, F.P; ROGER, J.A. & CUZZUOL, G.R.F. Controle da calogenese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, p. 987-996, 2008.

WILHELM, E. Micropropagation of juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, Dordrecht, v. 57, p. 57-60, 1999.

WOLTER, K.E. Root and shoot initiation in aspen callus cultures. **Nature**, London, v. 219, p. 509-510, 1968.

YAKOVLEV, M.S.; YOFFE, M.D. On some peculiar features in the embryogeny of *Paeonia* L. **Phytomorphology**, New Delhi, v. 7, p. 74-82, 1957.

ZAVATTIERI, M.A.; FREDERICO, A.M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example os stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2010.

ZHANG, C.L.; CHEN, D.F.; ELLIOTT, M.; SLATER, A. Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **In Vitro Cell Development Biology Plant**, New York, v. 37, p. 305–310, 2001.

ZIAUDDIN, A.; KASHA, K.J. long-term callus of diploid Barley (*Hordeum vulgare*). I. Auxin effects on culture initiation and maintenance. **Euphytica**, Wageningen, v. 48, p. 171-176, 1990.