

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

**Atuação de “pulse” na organogênese de *Eucalyptus grandis*
cultivado *in vitro***

Wirifran Fernandes de Andrade

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Recursos Florestais com opção em
Silvicultura e Manejo Florestal**

**Piracicaba
2006**

Wirifran Fernandes de Andrade
Biólogo

Atuação de “pulse” na organogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro*

Orientador:
Prof. Dr. MARCÍLIO DE ALMEIDA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Recursos Florestais. Área de concentração: Recursos Florestais, com opção em Silvicultura e Manejo Florestal

Piracicaba
2006

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Andrade, Wirifran Fernandes de
Efeito de "pulse" na organogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro* / Wirifran
Fernandes de Andrade. - - Piracicaba, 2005.
55 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Essência florestal 2. Eucalipto 3. Histologia 4. Micropropagação vegetal 5. Regulador de
crescimento vegetal I. Título

CDD634.9734

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

DEDICO

Aos meus pais:

**Edileuza Fernandes de Andrade e Francisco de Assis de Andrade,
que mesmo sem entender verdadeiramente o que eu estava fazendo
ou para onde estava caminhando, confiaram e apoiaram-me
incondicionalmente.**

Agradecimentos

A Força maior que rege tudo;

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida pela orientação;

Ao Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves pela co-orientação e pela amizade;

Ao Carlos David Vera Bravo pela amizade e ajuda na Análise Estatística;

A Dra. Cristina de Almeida, pela ajuda e sugestões e principalmente pelas risadas;

A Diva Correia pelas conversas, carinho e suporte nas fotografias;

Aos técnicos José R. Romanini (LAFISA) e Cássia R. F. Figueiredo (Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva), pela ajuda;

Ao Galaor de Araujo Bortoletto pelo companheirismo e suporte nas traduções dos documentos;

Ao Eduardo Villaça pela ajuda irrestrita;

A todos os amigos que freqüentam ou freqüentaram a Sala dos Alunos da Pós e aos colegas de curso que vivenciaram essa etapa;

Aos moradores e ex-moradores da Vila da Pós-Graduação pela acolhida.

Ao CNPq pela concessão da bolsa

Um cheiro grande no coração de todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Eucalyptus sp.....	14
2.2 Considerações sobre micropropagação	15
2.3 Processo organogênico	17
2.3.1 Interação entre reguladores de crescimento na organogênese.....	19
2.4 Efeito do pH na cultura de tecidos.....	21
2.5 Uso de “pulse” na indução de organogênese.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Material vegetal	25
3.2 Meio de cultura.....	25
3.3 Explantes e desenvolvimento do experimento	25
3.4 Análise das variáveis	27
3.5 Análise estatística	28
3.6 Estudo histológico dos explantes.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Efeito da interação dos fatores (BA x Tempo x pH) na multiplicação <i>in vitro</i>	29
4.2 Indução de brotações	31

4.3 Taxa de multiplicação.....	39
4.5 Análise histológica	42
5 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Brotos de <i>E. grandis</i> usados como explantes iniciais no experimento.....	27
Figura 2 - Explantes de <i>E. grandis</i> : a) explantes iniciais; b) aos 21 dias de cultivo em T4.....	31
Figura 3 - Valores médios referentes à produção de massa fresca do <i>Eucalyptus grandis</i> no tratamento T4.....	33
Figura 4 - Número médio de brotos por tratamento de <i>E. grandis</i> em relação a concentrações de BA e tempo de exposição após 21 dias de cultura <i>in vitro</i>	35
Figura 5 - Aspecto geral dos explantes cultivados em concentrações de BA e tempo de exposição após 21 de cultura <i>in vitro</i> . Com exceção do controle, cada duas plantas correspondem a um tratamento.....	37
Figura 6 - Detalhe das plântulas nos tratamentos após 21 dias de cultura <i>in vitro</i> . Plântulas de <i>E. grandis</i>	38
Figura 7 - Número médio de brotos/explante (* Taxa de multiplicação) de <i>E. grandis</i> em relação a concentrações de BA e período de exposição aos 21 dias de cultura <i>in vitro</i>	39
Figura 8 - Produção de biomassa de brotações de <i>E. grandis</i> aos 21 dias de cultivo <i>in vitro</i> . a) Massa fresca (mg); b) Massa seca	41

- Figura 9 - Fotomicrografia em estereomicroscópio Micronal de cortes transversais dos explantes, destacando a diferença de resposta da região basal após 21 dias em cultura no tratamento a) testemunha, b) T4 e c) T5. Setas = região com elevada atividade meristemática Barra = 500µm 42
- Figura 10 - Fotomicrografia em microscópio Zeiss do corte transversal da região basal do explante aos 21 dias de cultivo no tratamento T2. Ep = Epiderme; C = Córtex; P = Procâmbio e M = Medula.....43
- Figura 11 - Fotomicrografia em microscópio Zeiss do corte transversal da região basal do explante, destacando a a formação de meristemóides, aos 21 dias de cultivo. a) T2; b) T4 e c) T5. C = Córtex; P = procâmbio e Mr = Meristemóide. Setas = Região cortical com elevada atividade meristemática..... 44
- Figura 12 - Fotomicrografia em microscópio Zeiss do corte transversal da região basal das plântulas de *E.grandis* destacando a região do procâmbio aos 21 dias de cultivo. a) T2 – sem alteração da epiderme e do córtex; b) T4 e c) T5. Ep = Epiderme; C = Córtex; Setas pretas = Protuberâncias epidérmicas e Setas vermelhas = Região cortical com elevada atividade meristemática45
- Figura 13 - Fotomicrografia em microscópio Zeiss do corte transversal da região basal do explante, destacando a região do procâmbio aos 21 dias de cultivo. a) T2; b) T4 e c) T5. C = Córtex; P = Procâmbio; Cp = cordão de procâmbio; X = Xilema e F = Floema. Seta = Meristemóide47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos com regulador de crescimento, tempo de exposição e pHs usados no experimento.....	26
Tabela 2 - Análise de variância do efeito dos fatores BA, pH e tempo sob a multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Eucalyptus grandis</i>	29
Tabela 3 - Redefinição dos tratamentos em consequência da ausência de resposta para os tratamentos com pH	30
Tabela 4 - Número médio de brotos de <i>E. grandis</i> em concentrações de BA e tempo de exposição.em resposta aos tratamentos..	32
Tabela 5 - Percentagem de sobrevivência dos explantes nas concentrações de BA e tempo de exposição..	36

RESUMO

Efeito do “pulse” na organogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro*

O gênero *Eucalyptus* tem se mostrado um dos mais vantajosos na produção de bens e serviços florestais pela silvicultura brasileira, principalmente por sua rapidez no crescimento. A propagação vegetativa de *Eucalyptus* spp. permite a rápida multiplicação de genótipos selecionados alcançando aumento imediato na produtividade dos plantios clonais. Com o objetivo de avaliar o efeito do “pulse” na propagação *in vitro* de *Eucalyptus grandis*, testou-se as interações entre concentrações de BAP (Benzilaminopurina), tempo de exposição e pH, bem como as alterações morfológicas que esses fatores causam na estrutura interna dos explantes. O trabalho foi realizado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP. Doses crescentes de BAP (0, 200, 400 e 600 mg.L⁻¹) expostas durante três tempos (1, 2 e 3 horas) com dois valores de pH (3,0 e 5,8) representavam os tratamentos. Após 21 dias de cultivo avaliou-se o número de brotos por tratamento, taxa de multiplicação e biomassa produzidas para cada tratamento. As análises histológicas também foram realizadas após o fim do experimento. O fator pH não apresentou nenhuma interação com os demais fatores. A concentração 200 mg.L⁻¹ de BAP durante 1 e 2 horas apresentaram os tratamentos mais significativos na multiplicação do *E. grandis*. Doses com 600 mg L⁻¹ de BAP apresentaram-se tóxicas aos explantes. Houve intensificação da divisão celular no parênquima cortical e procâmbio na região basal do explante representada pelo surgimento de meristemóides evidenciando a maior capacidade de resposta organogênica desses tecidos em resposta aos tratamentos 200 mg.L⁻¹ de BAP durante 1 e 2 horas. O uso de “pulse” como ferramenta na micropropagação de *Eucalyptus grandis* representa uma alternativa viável para redução de tempo e custos.

Palavras-chaves: micropropagação; essência florestal; histologia; regulador de crescimento

ABSTRACT

Pulse effect on *Eucalyptus grandis* organogenesis *in vitro*

The genus *Eucalyptus* has proved to be one of the most profitable means of producing goods and supplying forestry services used by Brazilian silviculture, mainly because of its fast growth. The vegetative propagation of *Eucalyptus* spp. allows the fast reproduction of selected genotypes aiming at the immediate increase of cloned plantations. By analyzing the pulse treatment effect *in vitro* propagation of *Eucalyptus grandis* the evaluation between the concentrations of Benzylaminopurine (BAP), time exposure and pH interaction such as its morphological changes that those factors caused in the internal structure of the explants. This work has been carried out at Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP. The treatments consisted of increasing doses of Benzylaminopurine (0, 200, 400 and 600 mg.L⁻¹), three exposure time (1, 2 and 3 hours) with two values of pH (3,0 e 5,8). The results were taken after 21-day of cultivation. The number of sprouts per treatment, the reproduction rate and the produced biomass for each treatment were recorded. In addition the histological analyses were also carried out at the end of the experiment. The pH did not present any form of interaction with the other factors but the most significant treatments of *E. grandis* reproduction was found in the concentration 200 of BAP during the 1st and 2nd hour. The dose 600 mg.L⁻¹ of BAP turned out to be toxic for the explants. It was observed that there was an increase of cell division in the cortical parenchyma and procambium represented by the arising of meristems resulting to a greater capacity of organogenetic answer of these tissues due to the response of 200 mg.L⁻¹ of BAP treatment during 1st and 2nd hours. The use of pulse treatment as a tool of micropropagation of *Eucalyptus grandis* represented a feasible alternative for the reduction of time and cost.

Keywords: micropropagation; forest species , histology; growth regulator

1 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Eucalyptus* sp têm merecido a atenção de empresas e instituições de pesquisa no Brasil devido ao aumento crescente de novos plantios, em função dos ganhos em produtividade florestal alcançado, visando atender a crescente demanda de madeira destinada a fins energéticos e de produção de celulose e papel (<http://www.sbs.org.br/>).

Para a propagação vegetativa de *Eucalyptus* sp. utiliza-se de métodos clássicos como estaquia e enxertia. A estaquia tem apresentado alguns problemas relativos ao baixo índice de enraizamento quando se utiliza material mais adulto, devido ao acúmulo de inibidores de enraizamento. Porém, mesmo a partir de material jovem, o enraizamento é baixo para algumas espécies de *Eucalyptus* (XAVIER; COMÉRCIO, 1996). Dessa forma, a cultura de tecidos pode ser um método alternativo na propagação de *Eucalyptus*, por oferecer vantagens sobre a estaquia tais como taxa mais elevada de multiplicação, menor necessidade de espaço físico, ausência de pragas e doenças durante o cultivo, além de fornecer técnicas mais seguras, à medida que se obtém um maior controle dos fatores envolvidos (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2002).

Vários fatores podem ser otimizados quando se trata de micropropagação, dentre eles, a redução do tempo de cultura pode auxiliar o processo da propagação *in vitro* mesmo sendo esse processo, na maioria das vezes, demorado e dispendioso na obtenção do protocolo para cada espécie (PULLMAN, 2003). A redução do tempo de cultura é particularmente benéfica para o estabelecimento de um sistema de produção de mudas eficaz, pois minimizaria drasticamente o tempo de incubação dos explantes resultando em maior taxa de produção em um curto intervalo de tempo (MONCALÉAN; ALONSO et al., 2005; KORBAN, 2004; TANG, 2001).

O uso de “pulse” como ferramenta na micropropagação, sobretudo em *Eucalyptus* sp, é direcionado à indução de raízes em estacas ou em plântulas micropropagadas, porém o potencial dessa técnica na multiplicação de genótipos já foi confirmado, e baseia-se na exposição do material vegetal a um determinado estresse externo visando uma resposta biológica, esse, pode variar em intensidade, duração e

concentração dependendo do objetivo (SRIVASTAVA et al., 2001; VIKRANTI; RASHID, 2003; STOJICIC et al., 2004; BENNETT, 2003; ANTHONY et al., 2004; EYMAR, 2000). Apesar do grande número de trabalhos usando essa ferramenta, nada se conhece do efeito que ocorre ao nível molecular durante o tempo que o material vegetal está sendo tratado, nem quais são os mecanismos de absorção, necessitando de maior ênfase de pesquisas na exploração desse estímulo, principalmente com relação às vias de regeneração. Em se tratando de multiplicação de *Eucalyptus* sp. *in vitro*, este trabalho é o primeiro que usou essa ferramenta aliada a cultura de tecidos visando multiplicação vegetativa na tentativa de minimizar o tempo de cultura para que isso venha responder em ganho de produtividade e redução de custos para empresas que utilizam a clonagem via cultura de tecidos na produção comercial de mudas.

A hipótese deste trabalho é que o “pulse” (BAP x pH x tempo de exposição) causam diferentes efeitos na indução da organogênese em *Eucalyptus grandis* cultivados *in vitro*. O objetivo do trabalho foi estudar o efeito do “pulse” no processo de multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis*, por meio da interação entre doses de BAP, tempo de exposição e pH, bem como observar as alterações morfológicas ocorridas durante o processo de organogênese.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Eucalyptus* sp.

O gênero *Eucalyptus* é nativo da Austrália e pertence à família Myrtaceae. Possui cerca de 600 espécies, além de um grande número de variedades e alguns híbridos (ANDRADE, 1961) Segundo SBS (2001) o *Eucalyptus* possui um grande destaque no cenário da silvicultura no Brasil e no mundo, devido a sua adaptabilidade, rapidez no crescimento, aliado à produção de fibras e polpa de madeira de alta qualidade. Essas vantagens vêm atraindo cada vez mais, grandes interesses empresariais, principalmente da indústria de papel e celulose. A indústria brasileira de papel e celulose, tem apresentado, nas últimas décadas um crescimento acelerado tornando-se, na década de 90, a sétima maior produtora de celulose, e décima primeira em produção de papel, sendo o *Eucalyptus* sp. o principal gênero usado como fonte de matéria prima. Seu grande uso na indústria florestal brasileira deve-se, principalmente ao investimento em programas de melhoramento genético e à aplicação de técnicas de propagação clonal. A alta produtividade é devido ao ótimo clima e condições de solo favoráveis. Diversos programas de melhoramento existem hoje no país contribuindo significativamente para o fornecimento de material superior para plantio (SBS, 2001).

No Brasil, o plantio florestal tem aumentado nos últimos 20 anos, ocupando uma área de 4,8 milhões de hectares em 2000, sendo 3,0 milhões de hectares com eucalipto (SBS, 2001). O clima tropical ou subtropical na maioria do território brasileiro permite um crescimento ininterrupto e, conseqüentemente, um rápido acúmulo de biomassa. A produção de mudas a partir de sementes e por meio de estaquia (plantios clonais) são os sistemas de produção mais utilizados. No sistema de produção de mudas por sementes, estas podem ser obtidas de plantios comerciais, áreas de produção ou de pomares porta sementes melhorados geneticamente por meio de seleções (MOURA; GUIMARÃES, 2003). Hoje, estima-se que já se plantou 3.500.000,00 há de *Eucalyptus* sp., onde cerca de 1.200.000,00 ha são clonais, estabelecidos com mudas produzidas usando enraizamento de estacas.

Entre os métodos de reprodução vegetativa desenvolvidos até o presente momento, em escala comercial, o principal é a estaquia, por ser uma técnica cujos

princípios já são bem conhecidos. Entretanto, essa técnica tem apresentado algumas dificuldades no processo de produção de mudas de certos clones, principalmente no que concerne ao enraizamento, à formação das mudas e o desenvolvimento da futura árvore. Com os avanços dos programas de melhoramento florestal conseguidos até o momento, toda tecnologia que facilita ou até mesmo possa viabilizar comercialmente a produção de determinados clones é atrativa. Portanto, a micropropagação se constitui uma importante ferramenta na propagação de clones tornando-os aptos economicamente ao processo de produção de mudas (FONTES, 2005)

2.2 Considerações sobre micropropagação

A propagação de plantas usando a cultura de tecidos tem sido realizada pelo emprego das culturas de protoplastos, células, tecidos e órgãos. Embora explantes vegetativos de espécies arbóreas, geralmente, sejam de difícil crescimento e diferenciação *in vitro*, a cultura de órgãos tem sido promissora para algumas espécies arbóreas, e empregada intensamente na propagação clonal. O uso da micropropagação, como ferramenta na propagação dos genótipos selecionados, é fundamental para auxiliar em programas de melhoramento, principalmente para espécies de difícil propagação (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2002).

A técnica de cultura de tecidos tem sido utilizada na propagação vegetativa de culturas agrícolas e ornamentais oferecendo alternativas na quebra de barreiras impostas pelos métodos clássicos de propagação vegetativa (MEHRA-PALTA; SMELTZER; MOTT, 1978) Essa técnica dependem de fatores tais como tipo, fonte e condição fisiológica do explante; meios de cultura e, principalmente, do tempo de exposição do explante aos reguladores de crescimento e a idade e a diferenciação do tecido do explante, além da habilidade dos tecidos a responder as mudanças destes reguladores durante a cultura (SUGIYAMA, 1999; TANG; HARRIS et al., 2004) O tempo adequado de exposição e, conseqüentemente, a remoção do regulador de crescimento da cultura é fundamental para o progresso da indução de órgãos e regeneração completa da planta (AMERSON; FRAMPTON; MOTT et al., 1987). A escolha do explante implica diretamente o resultado obtido na micropropagação afetando a capacidade de regeneração, uma vez que esta é dependente de fatores tais como o

genótipo, condição ambiental e estado de maturação da planta matriz. Para a maior parte dos trabalhos de micropropagação, utiliza-se como explante inicial uma gema apical ou gemas axilares. Porém, em algumas espécies, o maior sucesso é obtido utilizando-se segmentos foliares, botões florais (ALMEIDA; KERBAUY, 1996) ou outros segmentos. O uso destes explantes é limitado a poucas espécies, uma vez que, em geral, forma-se calo a partir destes explantes. Como formação de calo (organogênese indireta) pode ser uma fonte de variação somaclonal, não há garantia de que o genótipo da planta matriz seja mantido inalterado, como é desejável na micropropagação (JAIN; DONG; NEWTON, 1989; PASQUAL, 2001).

No *Eucalyptus* sp. o processo de propagação *in vitro* tem sido discutido com resultados satisfatórios, principalmente com relação a composição de meio, efeito dos reguladores de crescimento e maximização dos protocolos obtidos para estabelecimento de mini jardins clonais, através da clonagem de indivíduos superiores que os programas de melhoramento genéticos ao longo dos anos conseguiram selecionar, que é uma estratégia usada atualmente por uma infinidade de empresas florestais (BLOMSTEDT, 1991; MacRAE; STADEN 1990; BENNETT, 1994; SITA; RANI, 1985). Dentre as vantagens desse processo podemos citar a uniformidade dos plantios e a adaptação de clones específicos para determinados sítios (XAVIER; COMÉRCIO, 1996).

Subbaiah e Minocha (1990) tiveram sucesso na micropropagação de *Eucalyptus tereticornis* por meio da cultura de calos com posterior regeneração dos brotos usando meio de cultura sólido suplementado com e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Hipocótilos do mesmo material também apresentaram tufo de plântulas após 5 semanas de cultivo com concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Outras espécies de *Eucalyptus* sp. merecem destaque no processo de micropropagação e/ou cultura de tecidos *in vitro*: *Eucalyptus grandis* (WARRAG et al., 1991; SHARMANE; MACRAE; STADEN, 1990; SITA; RANI, 1985), *Eucalyptus reganans* (BLOMSTEDT et al., 1991), *Eucalyptus urophylla* (XAVIER; COMÉRCIO, 1996), *Eucalyptus globulus* (BENETTI et al., 1994).

2.3 Processo organogênico

A regeneração das plantas pode ocorrer, a princípio, por duas principais rotas, as quais são geralmente bem distintas: a organogênese e a embriogênese (TANG; HARRIS et al., 2004). Novos órgãos como brotos e raízes podem ser induzidos *in vitro* e, quando isto ocorre, são denominados adventícios. Tecidos ou órgãos que têm capacidade para morfogênese são ditos morfogênicos (morfogenéticos). Organogênese obtida através da cultura de tecidos representa um modelo para o estudo dos mecanismos regulatórios no desenvolvimento das plantas (SUGIYAMA, 1999). Uma das principais características da cultura de tecidos *in vitro* é o controle, quase absoluto, das respostas morfogênicas que os explantes venham a apresentar. Segundo Phillips (2004) as etapas iniciais do processo de desenvolvimento da organogênese, em nível molecular, ainda são pouco conhecidas, daí a importância de se conhecer quais são os componentes e propriedades dos meios de cultura (PASQUAL, 2001).

A organogênese geralmente se dá pela otimização da relação citocinina/auxina no meio de cultura e ocorre pela diferenciação de órgãos e brotos diretamente do explante (organogênese direta) ou do calo (organogênese indireta) podendo originar-se de uma única célula ou de um conjunto de células. A organogênese caracteriza-se por ser uma estrutura monopolar e apresenta ampla conexão vascular dos órgãos formados com o explante. A morfogênese embriogênica, geralmente, é induzida por tratamento com auxinas potentes e resulta na formação de estruturas não zigóticas semelhantes a um embrião, tendo sua origem uni ou multicelular, de células pré-embriogênicas determinadas (embriogênese direta) ou de células embriogênicas determinadas induzidas (embriogênese indireta). A embriogênese caracteriza-se, principalmente, por apresentar estrutura bipolar e sistema vascular fechado (THORPE, 1995 citado por GUIDOLIN, 2003).

Atualmente, várias espécies têm apresentado resultados satisfatórios à indução de organogênese em espécies arbóreas, principalmente através da embriogênese somática. Embriogênese somática fornece um excelente modelo para entender como uma ou um conjunto de células vegetativas adquirem características embriogênicas. Essas células servem de base para estudos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos na expressão da totipotência

celular. Segundo Mehra-Palta, Smeltzer e Mott (1978), o principal objetivo desses trabalhos é desenvolver processos para reverter às células e tecidos diferenciados ao estado embriogênico visando o controle da morfogênese. O processo ocorre em etapas semelhantes a embriogênese zigótica. Porém, apesar dos esforços, há uma baixa taxa de regeneração dos embriões somáticos tornando dificultosa a aplicação dessa tecnologia (BECWAR; PULLMAN, 1995; TANG et al., 2001). Para Higashi, Silveira e Gonçalves, 2000 essa dificuldade está relacionada à maturação e germinação dos embriões somáticos e desenvolvimento de plântulas somáticas viáveis.

Embriogênese somática em *Pinus patula* foi observada após a indução de gemas nos calos oriundos de brotos apicais de árvores adultas cultivados em meio sólido (GUPTA; DURZAN, 1985) suplementado com 80 μM de BAP e mantidos no escuro durante 10 a 14 semanas (MALABADI; STADEN, 2005). A propagação de espécies arbóreas através da embriogênese somática pode auxiliar no sistema de produção diminuindo o custo e melhorando a qualidade e a uniformidade da madeira através da rápida propagação dos genótipos selecionados, porém, a principal barreira para comercialização desta tecnologia é a baixa taxa de conversão e germinação que os embriões apresentam (PULLMAN et al., 2003). Concentrações de 8,9 μM de BAP com 0,5 μM de IBA acrescidas ao meio de cultura desencadearam diferenciação em calos de *Pinus virginiana* Mill resultando em embriogênese somática durante 9 semanas de cultivo e, posterior regeneração das plântulas (TANG; NEWTON, 2004).

Van Staden e Malabadi (2005) avaliaram os fatores como pré-tratamento de gemas apicais de *Pinus patula* em baixas temperaturas; composição do meio e concentrações de reguladores de crescimento que poderiam afetar a embriogênese somática. Observaram que o pré-tratamento dos explantes em 2°C por 3 dias em meio contendo carvão ativado (0,3%) foi o fator mais significativo, produzindo maior taxa de tecido embriogênico em comparação à cultura controle, embora não tenha sido elucidado o mecanismo de ação que o pré-tratamento causava no controle da embriogênese somática. Segundo os autores a conversão de células somáticas em células potencialmente embriogênicas não segue uma rota específica de desenvolvimento, podendo ser influenciada pelas condições do ambiente.

2.3.1 Interação entre reguladores de crescimento na organogênese

Os reguladores de crescimento são largamente usados na cultura de tecidos na indução de embriogênese somática ou organogênese. O efeito das citocininas em cultura de tecido ou órgãos pode variar de acordo com a substância utilizada, o tipo de cultura, a variedade da planta e da idade do tecido que deu origem ao explante. Em geral, estimulam a síntese protéica sendo mais evidenciada em culturas de tecidos onde elas são usadas freqüentemente junto com as auxinas para estimular a divisão celular e controlar a morfogênese (MOTT; AMERSON, 1981).

Desde a descoberta de Skoog e Miller (1957) em cultura de calos de tabaco onde foram induzidas brotações usando níveis baixos de auxina comparados aos de citocinina, muitos aspectos da diferenciação celular e organogênese nas culturas de tecidos de órgãos, foram controlados por interação entre as concentrações de auxina e citocinina (PASQUAL, 2001).

Para o estabelecimento de um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro*, é necessário um adequado balanço entre auxinas e citocininas. As citocininas parecem ser necessárias para a divisão celular da planta, porém podem ter um efeito antiauxina. Podendo ainda ter efeito tóxico em altas concentrações, como mostrado por David Blakesley (1991) estudando a absorção de BAP na organogênese *in vitro* de *Musa* e *Rhododendron ponticum*. Isso foi percebido devido à barreira que alguns dos explantes apresentavam a determinada concentração de BAP como se protegessem o tecido da toxicidade.

O principal regulador de crescimento utilizado na cultura de tecidos usando espécies lenhosas com objetivo de organogênese é a citocinina 6-Benzilaminopurina (BAP). Parte dos efeitos biológicos produzidos pelas citocininas poderia ser próprio da sua inibição da oxidação do AIA. A absorção das citocininas dentro dos tecidos é rápida. Uma enzima que ocorre naturalmente, a citocinina-oxidase, degrada citocininas tais como a zeatina e a adenina-isopentil. Em vários tipos de tecidos de planta, a atividade da citocinina oxidase é aumentada pela aplicação endógena de citocininas, sugerindo que, tratando plantas com citocininas sintéticas, poderia diminuir o nível de substâncias endógenas naturais. Em sua ausência, a metáfase da mitose é

consideravelmente alongada podendo o efeito variar de acordo com a substância utilizada, o tipo de cultura e da idade do tecido que deu origem ao explante. Doses altas de reguladores de crescimento podem induzir significativamente a capacidade de regeneração no tecido vegetal em curto intervalo de tempo. Cotilédones de *Pinus virginia* cultivados durante 2 horas em meio sólido suplementado com 44,4 μM de BAP comparado à mesma concentração com 16 dias, apresentou alta taxa de regeneração (MONCALEAN; ALONSO; CENTENO; CORTIZO et al., 2005).

Os tecidos de calos, nos quais a divisão celular ocorre sem a adição de citocinina ao meio de cultura, são aptos a produzir suas próprias substâncias de crescimento e são eficientes em promover a iniciação direta ou indireta de brotações (PASQUAL, 2001). Avanços estão sendo feitos para entender a ação dos reguladores de crescimento, principalmente em nível molecular, como sinalizadores de membranas e suas interações com os genes envolvidos no processo de morfogênese nas plantas. Vários genes já foram identificados, por exemplo, o CRE1 que supostamente é um receptor de citocinina e o CYCD3 envolvido na aquisição de competência para organogênese (PHILLIPS, 2004).

Como já mencionado, o balanço entre os dois tipos de reguladores é usualmente requerido para iniciar o crescimento ou diferenciação em culturas de tecidos. Porém algumas vezes, o nível de auxina presente no tecido pode ser suficiente para estabelecer o balanço auxina/citocinina e desencadear o processo organogênico (VILLALOBOS-AMADOR et al., 2002).

O intervalo de dosagens de BAP adicionadas aos meios de culturas usados nos experimentos com espécies arbóreas variam de 0,44 μM a 80,0 μM aumentando ou diminuindo a eficiência de regeneração dependendo da espécie envolvida, podendo decrescer com o aumento da concentração e tempo de exposição (SCHESTIBRATOV; MIKHAILOW et al., 2003).

2.4 Efeito do pH na cultura de tecidos

O processo de morfogênese é freqüentemente dependente do nível do pH do meio de cultura, dado que a disponibilidade e absorção dos nutrientes e dos reguladores de crescimento pelos tecidos cultivados são diretamente afetadas pelo pH, bem como afeta a eficiência do agar. A disponibilidade e absorção de moléculas orgânicas são também afetadas pelo pH, como por exemplo à absorção de AIA, ANA, 2,4-D e ácido Abscísico serão maiores quanto mais ácidos for o meio e quanto maior for a diferença entre seus pHs e aquele do citoplasma da célula (PASQUAL, 2001).

Devido à absorção diferencial de ânions e cátions, e das substâncias exsudadas pelos tecidos das plantas, que estão sendo cultivadas, dentre outros fatores, o pH do meio de cultura em geral não permanece constante. As alterações que ocorrem no pH de qualquer meio diferem amplamente como mostrado por Eymar et al., (2000) quando estudou o efeito da autoclavagem e do carvão ativado, adicionados ao meio, no nível do pH verificando que ambos influenciavam o pH do meio. A autoclavagem reduzia o pH em 1.03 unidades e o carvão ativado aumentava em 0.38 unidades, respectivamente. Os autores ainda enfatizam que a questão do aumento ou diminuição do pH pela autoclavagem e/ou adição de carvão ativado ainda é incipiente na literatura onde alguns autores encontraram efeitos contraditórios aos verificados por eles. Porém, o efeito do pH nas respostas que as plantas cultivadas *in vitro* venham apresentar ainda é desconhecido (BENNETT et al., 2003). Sugere-se que pode auxiliar na ação da auxina ou que o pico de ação da auxina é dependente de um determinado valor de pH e que a presença de auxinas no meio que o torna mais ácido, promovendo um efluxo de íons H^+ através da parede celular, que é acompanhado por um influxo de íons potássio.

Anthony et al. (2004) verificaram que a produção de calos em folhas de *Leucopogon verticillatus* foi drasticamente reduzida em pH menor que 6.0 obtendo melhor taxa de crescimento em pH 6,4 e que a troca iônica entre o material vegetal e o meio de cultura foi a razão pela manutenção do equilíbrio do pH no meio.

2.5 Uso de “pulse” na indução de organogênese

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 (FLYGH, 1993; KOVAC, 1993; SHEKHAWAT et al., 1993; DEORA; SHEKHAWAT, 1995; Das PRAKASH, SARIN, 1999; PUROHIT; SINGHVI, 1998). Segundo Mathur e Nadgauda (1999) esses tipos de estudos são importantes para a redução: do tempo de exposição do regulador de crescimento à cultura; do período de indução e; do custo do material usado no laboratório. Vários são os tipos de “pulse” usados em experimentos na indução de organogênese, como por exemplo pulse de luz (PINKER, 2000) “pulse” de pulverização (LIGHT et al., 2002) e “pulse” de reguladores de crescimento (SRIVASTAVA et al., 2001; VIKRANTI; RASHID, 2003; STOJICIC et al., 2004; BENNETT, 2003; ANTHONY et al., 2004; EYMAR, 2000; MATHUR; NADGAUDA, 1999).

O uso de “pulse” (1 mg L⁻¹ de BAP) durante dias alternados causou uma multiplicação de 8 brotos por plântula de *Litchi chinesis* Sonn. durante 7 semanas de cultivo. A solução era fornecida ao explante em papel de filtro durante todo o dia. Para o enraizamento, as plântulas foram pré-tratadas com 25,0 mg L⁻¹ de IBA por 5 minutos. Essa concentração se mostrou a melhor levando a uma taxa de enraizamento em torno de 80% (Das PRAKASH; SARIN, 1999). A mesma auxina foi testada usando concentrações de 0,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 500,0 mg L⁻¹ durante os tempos de 1, 2, 3 e 4 horas visando enraizamento em plantas micropropagadas de *Achras sapota*. A maior taxa de enraizamento foi de 77% após 15 dias do pré-tratamento (200,0 mg.L⁻¹) por 2 horas (PUROHIT; SINGHVI, 1998). Semelhantemente, kulchetscki et al. (1995) conseguiram o melhor enraizamento de brotos micropropagados de *Abies amabilis* através de “pulse” de IBA (1 mM) com taxa de 14 e 17% durante 2 ou 4 horas, respectivamente.

Na tentativa de desenvolver metodologia eficaz para progação de *Pinus heldreichii*, Stokjicic e Budimir (2004) utilizaram hipocótilos e cotilédones como explantes tendo como tratamento doses crescentes de BAP (0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 50,0 e 100,0 mg.L⁻¹) fornecidas como “pulse” durante 1 hora. Após duas semanas de cultivo em meio sem reguladores de crescimento já era notável o desenvolvimento da

gemas, os explantes submetidos à dose de 50 mg L^{-1} apresentaram maior frequência de gemas axilares (4,6 brotos por explante) e maior índice de desenvolvimento de brotos. As concentrações acima de 1.0 mg L^{-1} estimularam a alongação das gemas. Também se observou formação de tecidos desorganizados nos explantes tratados com 50 e 100 mg.L^{-1} . Segundo os autores, essas más formações são comuns na cultura de tecido *in vitro* podendo resultar em plântulas com morfologia e fisiologia anormal que podem vir a ser reparadas quando essas forem transferidas às condições *ex vitro*. Concentração semelhante de BAP (400 mg L^{-1}) durante 30 minutos promoveu uma capacidade de indução em embriões de *Pinus wallichiana* de 3.78 por embrião em comparação ao controle usando somente água (MATHUR e NADGAUDA, 1999). Para Drake et al., (1997) o método de “pulse” (100 mg L^{-1} de BAP por 2 horas) 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*.

Vikranti e Rashid (2003) estudando o efeito de “pulse” na organogênese de *Paspalum scrobiculatum* conseguiram culturas de calos embriogênicos em embriões usando tratamentos de 2,4-D ($100 \mu\text{M}$) durante 4 e 7 dias. Observou também que alguns embriões não chegaram a germinar e passaram diretamente a formação e calo e posterior regeneração. Eles afirmam que as células não são pré-programadas para um modo específico de regeneração. Sua rota seja embriogênese ou organogênese é dependente do tempo e da concentração que a cultura é submetida; bem como, lançaram a seguinte pergunta: É simplesmente a exposição à auxina em diferentes durações que resulta em organogênese ou embriogênese, ou fatores endógenos também estão envolvidos?

Embriogênese somática também foi induzida através de “pulse” quando inflorescências de *Liquidambar styraciflua* tiveram como fator de indução “pulse” de TDZ ($0.01\text{-}1 \text{ mg L}^{-1}$) durante o período de uma semana e posterior cultivo em meio isento de reguladores de crescimento. Com isso ficou mostrado que tecidos maduros dessa espécie tem habilidade para produzir culturas embriogênicas quando fornecido o estímulo apropriado (MERKE et al., 1997).

Em *Eucalyptus* não existe literatura relatando o uso dessa ferramenta na multiplicação *in vitro* apesar do gênero ser alvo de inúmeras pesquisas utilizando a técnica de cultura de tecido *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

O trabalho foi conduzido nos laboratórios de Fisiologia das Árvores do Departamento de Ciências Florestais - fase de cultivo *in vitro* – e, de Biologia Reprodutiva e Morfogênese de Plantas do Departamento de Ciências Biológicas - fase de análise histológica - ambos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo. Clones de *Eucalyptus grandis* foram utilizados como explantes nesse experimento, e após o estabelecimento da cultura *in vitro*, o melhor clone foi selecionado baseado no potencial de regeneração que o material apresentou *in vitro*.

3.2 Meio de cultura

O meio de cultura JAD`S (CORREIA et al, 1995) usado como meio básico foi suplementado com Meso Inositol (100 mg.L^{-1}), Tiamina ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), Piridoxina ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), Ácido Nicotínico ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), Pantetonato de Cálcio ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), Sacarose (30 g.L^{-1}) e Agar (5 g.L^{-1}), sendo o pH ajustado com HCl para 5,8 antes da adição do agente geleificante e autoclavagem ($121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min).

3.3 Explantes e desenvolvimento do experimento

Como explante utilizou-se os dois primeiros nós e suas folhas, da região subapical de plântulas cultivadas *in vitro* com aproximadamente 2 cm de altura. Soluções contendo concentrações de BAP (Benzilaminopurina) e $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA (Ácido Indol Acético) para todos os tratamentos, foram preparadas em frascos com 100 ml, o controle apenas com AIA, constituindo dessa forma a solução de “pulse”, e o pH ajustado antes da autoclavagem para o nível de cada tratamento, como listado na tabela 1.

Tabela 1 - Tratamentos com regulador de crescimento, tempo de exposição e pHs usados no experimento

Tratamento	Benzilaminopurina (BAP) mgL⁻¹	Tempo do “pulse” (horas)	PH
T1	0	1	5.8
T2	0	1	3.0
T3	0	2	5.8
T4	0	2	3.0
T5	0	3	5.8
T6	0	3	3.0
T7	200	1	5.8
T8	200	1	3.0
T9	200	2	5.8
T10	200	2	3.0
T11	200	3	5.8
T12	200	3	3.0
T13	400	1	5.8
T14	400	1	3.0
T15	400	2	5.8
T16	400	2	3.0
T17	400	3	5.8
T18	400	3	3.0
T19	600	1	5.8
T20	600	1	3.0
T21	600	2	5.8
T22	600	2	3.0
T23	600	3	5.8
T24	600	3	3.0

Os explantes foram embebidos na solução de tratamento “pulse” e depois de completado período de cada tratamento, esses eram deixados para secagem rápida e posteriormente foram inoculados verticalmente em frascos contendo 40 ml de meio de cultura JAD`S (CORREIA et al, 1995) (Figura 1). A cultura foi mantida em sala de crescimento com temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e iluminância de $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4000 lux), fornecida por luz branca fria localizada 30 cm acima do nível de cada prateleira, provenientes de duas lâmpadas de 110 W, modelo H.O, marca Sylvania de 249 cm de comprimento durante todo o tempo de experimentação.



Figura 1 - Brotos de *E. grandis* usados como explantes iniciais no experimento

3.4 Análise das variáveis

As análises das variáveis foram feitas aos 21 dias de cultivo avaliando-se: número de explantes sobreviventes; número de explantes sobreviventes, mas sem resposta; número de gemas obtidas por explante e; biomassa. Para acompanhar o desenvolvimento dos explantes, foi feito resgate semanal de uma amostra por tratamento para obtenção de massa fresca e seca durante 21 dias totalizando quatro

coletas. As plântulas foram retiradas dos fracos de cultura e individualmente pesadas em balança analítica com precisão de milésimo de grama, e em seguida foram acondicionadas em embalagens individuais de papel e secas em estufa a uma temperatura de 60°C até atingir peso constante.

3.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 24 tratamentos, sendo quatro concentrações de BAP, três tempos de exposição e dois valores de pH estabelecendo um fatorial 4x3x2 repetido cinco vezes totalizando 120 unidades experimentais. As análises estatísticas foram realizadas pelo procedimento GLM do pacote estatístico Statistical Analysis System – SAS.

3.6 Estudo histológico dos explantes

Os explantes foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) durante 72 horas, sendo retirado o ar contido nos espaços intercelulares com auxílio de uma bomba de vácuo. Após a fixação, as amostras passaram por desidratação em série crescente alcóolica-etílica 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% (v/v), permanecendo por 10 min em cada uma e em seguida foram infiltradas com historesina hydroxyetilmetacrilato (LEICA-HISTORESIN) de acordo com as recomendações do fabricante. Os cortes foram obtidos com navalha do tipo C em micrótomo rotativo manual (Leica), com secções longitudinais de 5 micrômetros de espessura, e posteriormente coradas com azul de toluidina 0,05% (v/v) com tampão fosfato e ácido cítrico e finalmente montadas em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan®). As lâminas histológicas foram fotomicrografadas em microscópio Zeiss, com a escala micrométrica nas mesmas proporções.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da interação dos fatores (BAP x Tempo x pH) na multiplicação *in vitro*

Dentre os fatores avaliados para a multiplicação dos brotos de *Eucalyptus grandis* a concentração de BAP e o tempo apresentaram influência direta, enquanto o pH não apresentou diferença significativa, como pode ser verificado pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 2), indicando a não participação do pH no processo de multiplicação em *E. grandis*.

Tabela 2 - Análise de variância do efeito dos fatores BAP, pH e tempo sob a multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis*

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Concentração (C)	3	109.97	109.97	88.7	<.0001*
Tempo (T)	2	38.36	38.36	46.45	<.0001*
PH	1	0.18	0.18	0.44	0.5083
C x T	6	14.02	14.02	5.66	0.0002*
C x pH	3	0.56	0.56	0.45	0.7164
T x pH	2	0.23	0.23	0.29	0.7492
T x pH x C	6	6.47	6.47	2.61	0.0684
Resíduo	96	48	19.82		
TOTAL	119	71	189.65		

*Significativo a 5%.

Vale salientar que os pHs das soluções após autoclavagem diferiam do ajustado antes desta, aumentando para 3,18 (+0,18) e 6,17 (+0,37). Essa informação se contrapõe à obtida por Eymar et al. (2000) que verificaram uma diminuição do pH das soluções pela autoclavagem em 1,03 unidades.

O efeito do pH no meio de cultura tem sido discutido por diversos autores destacando sua função na absorção dos nutrientes e reguladores de crescimento afetando a taxa de crescimento durante o tempo de cultura em meio sólido que geralmente é maior de quatro semanas (EYMAR et al., 2000; BENNETT et al., 2003;

ANTHONY et al., 2004), o que permite relacionar a falta de interação do pH nos resultados desse experimento, ao curto período de exposição dos explantes aos tratamentos; que por se tratar de “pulse” (horas), esse tempo pode ter sido insuficiente para absorção do regulador de crescimento BAP; ou ainda por ser o regulador testado uma citocinina. Segundo Pasqual (2001) a absorção de auxinas é proporcional à acidez do meio e à maior diferença entre seu pH e o do citoplasma da célula, concluindo desse modo, que a acidez é necessária para ação das auxinas não mostrando evidências da dependência do pH para absorção das citocininas. Como o pH não apresentou influência nos resultados e para melhor compreensão da discussão, os 24 tratamentos (apresentados na Tabela 1) foram redefinidos pela exclusão do fator pH, passando a 12 tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 - Redefinição dos tratamentos em consequência da ausência de resposta para os tratamentos com pH

Tratamento	Benzilaminopurina (BAP) mgL⁻¹	Tempo do “pulse” (horas)
T1	0	1
T2	0	2
T3	0	3
T4	200	1
T5	200	2
T6	200	3
T7	400	1
T8	400	2
T9	400	3
T10	600	1
T11	600	2
T12	600	3

4.2 Indução de brotações

As doses de BAP fornecidas na forma de “pulse” promoveram, de modo geral, um aumento no processo de indução do número de brotações de *E. grandis* cultivados *in vitro* aos 21 dias de cultura (Figura 2).

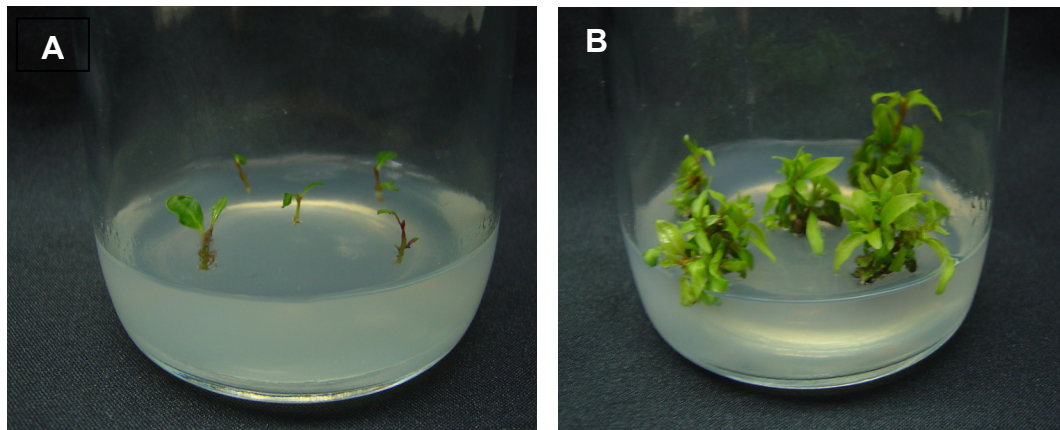


Figura 2 - Explantes de *E. grandis*: a) explantes iniciais; b) após 21 dias de cultivo em T4

Esse resultado ratifica o potencial dessa ferramenta na multiplicação *in vitro* de espécies lenhosas através da micropropagação, porém a maioria das pesquisas (Das PRAKASH; SARIN, 1999; STOKJICIC; BUDIMIR, 2004; MATHUR; NADGAUDA, 1999; DRAKE et al., 1997 VIKRANTI; RASHID 2003) utilizaram tecidos embriogênicos como fonte de explante por apresentarem maior potencial morfogênicos, não explorando a capacidade de resposta de outros explantes com maior nível de maturação. Diferentemente do que foi discutido para essências florestais, e confirmando os resultados desta pesquisa, MERKLE et al. (1997) avaliou o efeito do “pulse” em tecidos diferenciados de inflorescência de *Liquidambar styraciflua*, na indução de embriogênese somática e constatou sua eficiência.

Observa-se na tabela 4, que o tratamento T4 proporcionou o maior número de brotações alcançando 35,17 brotos em média por tratamento, diferindo de todos os tratamentos e da testemunha.

Tabela 4 - Número médio de brotos de *E. grandis* em concentrações de BAP e tempo de exposição em resposta aos tratamentos

	TRATAMENTOS		VAL. MÉDIOS* Números de brotos
	BAP (mgL ⁻¹)	Tempo (horas)	
T1	0	1	19,83 ^{defg}
T2	0	2	21,00 ^{bcdefg}
T3	0	3	17,50 ^{fg}
T4	200	1	35,17 ^a
T5	200	2	32,17 ^{abcd}
T6	200	3	16,00 ^{efgh}
T7	400	1	20,83 ^{cdefg}
T8	400	2	8,33 ^{hij}
T9	400	3	4,67 ^{ijl}
T10	600	1	12,17 ^{ghi}
T11	600	2	2,67 ^{jl}
T12	600	3	0,17 ^l

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Esse aumento no número de brotos pode ser evidenciado na figura 3 referente à massa fresca. Apesar de um ligeiro aumento da massa fresca entre 7 e 14 dias, a maior produção ocorreu entre 14 e 21 dias de cultivo, mostrando que o desenvolvimento dos brotos ocorreu durante esse período de cultivo. Resultados esses observados através das coletas de dados de massa fresca e seca realizadas semanalmente.

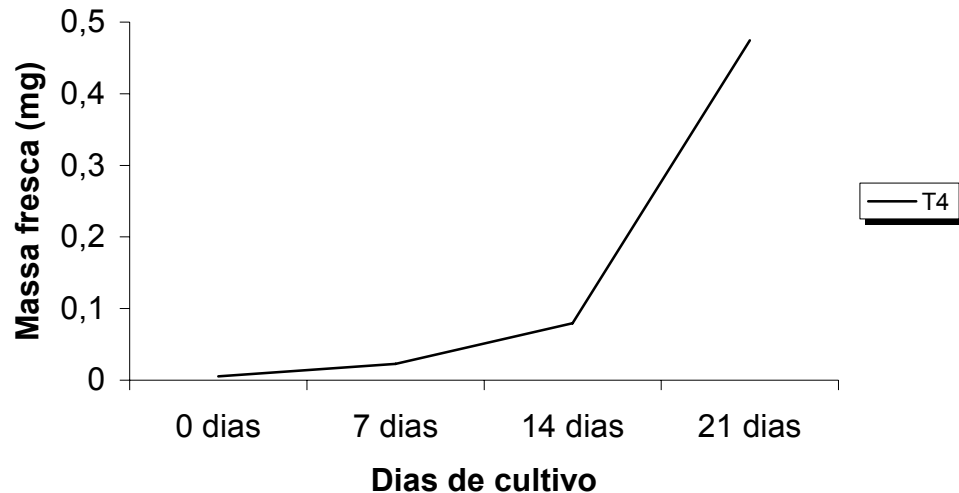


Figura 3 - Valores médios referentes à produção de massa fresca de *Eucalyptus grandis* no tratamento T4

Esse mesmo tempo de exposição, ou seja, 1 hora, combinado com 50 mgL⁻¹ de BAP foi responsável pela indução de gemas em hipocótilos e cotilédones no trabalho desenvolvido por Stokjic e Budimir (2004) onde testaram doses crescentes de BAP (0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 50,0 e 10,0 mg.L⁻¹). A concentração de 1,0 mg L⁻¹ causou alongamento das gemas e com 10,0 µM surgiram calos na porção dos hipocótilos que estavam em contato com o meio de cultura. A exposição de 22,1 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 4 dias também foi responsável pela formação de calos diretamente nos embriões de *Paspalum scrobiculatum* sem que esses passassem pelo processo de germinação (VIKRANTI; RASHID, 2003). Segundo os autores, a rota de regeneração das células vegetais não segue um caminho específico, sendo dependente da intensidade e duração do estímulo a que as células são submetidas, bem como de fatores endógenos. Esses fatores representam eventos moleculares que ainda não estão bem elucidados na morfogênese de plantas apesar dos grandes avanços obtidos com a descoberta de gens relacionados ao processo de competência celular para organogênese (PHILLIPS, 2004).

Ainda na figura 2-B, pode-se perceber a quantidade de brotos formados em função do tratamento T4. Com 2 horas de exposição observou-se uma ligeira diminuição no número de brotos por tratamento (32,17), mas em 3 horas de exposição

o número de brotos diminuiu significativamente para uma média de 16 brotos, evidenciando que a interação entre a concentração e esse tempo influenciou no número de brotos.

Levando-se em consideração a presença de BAP, o terceiro maior número de brotações por tratamento (20,83) foi conseguido com a concentração de 90 mg L⁻¹ durante 1 hora de exposição e não mostrou diferença significativa da testemunha, porém apresentou diferença entre os tratamentos da mesma concentração com números de brotos por tratamento de 8,33 para 2 horas e 4,67 para 3 horas, bem como da concentração de 200 mg L⁻¹ com o mesmo tempo de exposição. Mathur e Nadguda (1999) utilizaram como metodologia para propagação de *Pinus wallichiana* o “pulse” de 90 mg L⁻¹ de BAP fornecidos a embriões zigóticos durante 30 minutos e observaram que após 3 semanas esse procedimento induziu embriões a eventos morfogênicos, propiciando uma multiplicação de 3.78 embriões por embrião.

Os tratamentos T8 e T9 apresentaram notável redução do número de brotos comparados a todos os demais tratamentos da testemunha. Esse resultado difere do encontrado por Drake et al. (1997), no qual 90 mg L⁻¹ de BAP por 2 horas foi o tratamento mais eficaz na micropropagação de *Picea stichensis* comparado à mesma concentração do regulador de crescimento no meio de cultura.

O menor número de brotações observados nos explantes após tratamento de “pulse” foi com a concentração de 600 mg L⁻¹. A interação entre 600 mg L⁻¹ e 1 hora de exposição, resultou em um número médio de 12,17 brotos por tratamento, que reduziu proporcionalmente ao período de exposição obtendo valores de 2,67 e 0,17 brotos/explante com 2 e 3 horas de exposição respectivamente, sendo esse último o menor valor de todo o experimento nessa variável-resposta podendo ser melhor visualizado na figura 4.

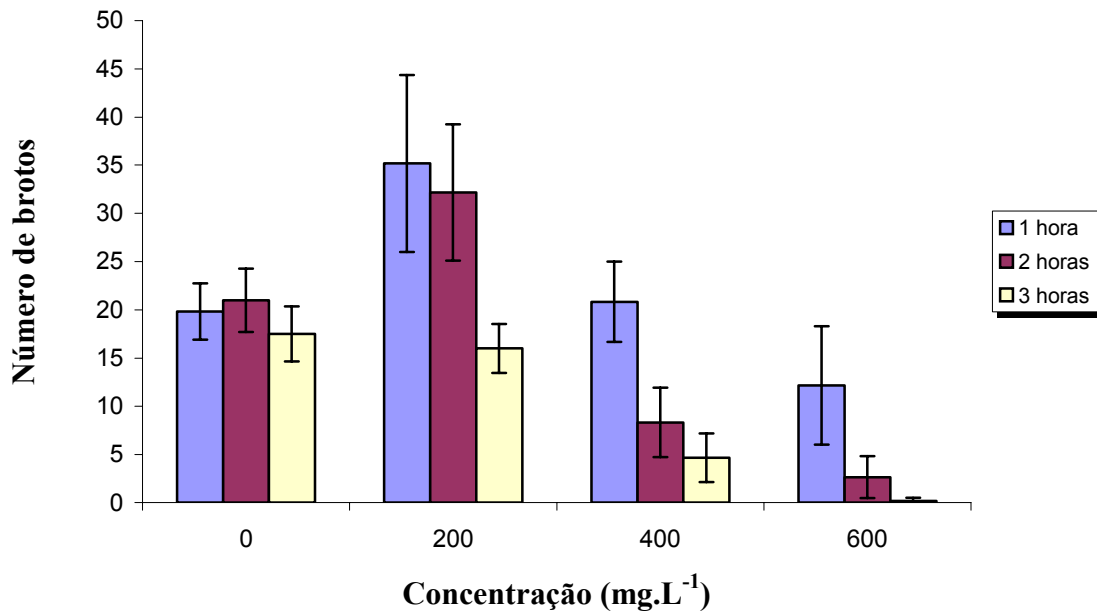


Figura 4 - Número médio de brotos por tratamento de *E. grandis* em relação a concentrações de BAP e tempo de exposição aos 21 dias de cultura *in vitro*

O aumento do número de brotações por tratamento não foi inversamente proporcional ao aumento da dosagem, evidenciando que as concentrações mais elevadas de BAP são inibitórias para o processo de multiplicação de *E. grandis*, como por exemplo, as dosagens 400 mg L⁻¹ por 2 ou 3 horas e todos os tratamentos com 600 mg.L⁻¹, apresentaram-se tóxicas para os explantes sendo responsável por uma taxa de sobrevivência de 50% com concentração de 400 mg L⁻¹ por 3 horas e de 0% com 600 mg L⁻¹ por 3 horas, possivelmente isso deve estar relacionado com a oxidação dos tecidos dos explantes, os quais apresentaram redução da sobrevivência das brotações (Tabela 5).

Tabela 5 - Percentagem de sobrevivência dos explantes nas concentrações de BAP e tempo de exposição

	TRATAMENTOS		Sobrevivência dos explantes (%)
	BAP (mg.L ⁻¹)	Tempo (horas)	
T1	0	1	100
T2	0	2	100
T3	0	3	100
T4	200	1	100
T5	200	2	100
T6	200	3	100
T7	400	1	97
T8	400	2	80
T9	400	3	50
T10	600	1	77
T11	600	2	34
T12	600	3	0

O efeito tóxico das altas doses de BAP na cultura de tecidos foi evidenciado por Blakesly (1991) quando obteve tendência a diminuição da taxa de multiplicação em *Musa* cultivados em 10 dias com doses elevadas de BAP. O autor notou que os explantes que permaneceram vivos desenvolviam uma barreira para a absorção do regulador de crescimento como forma de tamponar o estresse causado pela dosagem. Por outro lado, menor período de exposição (2 horas) foi igualmente prejudicial à sobrevivência considerando uma taxa de sobrevivência menor que 50%. Ainda de acordo com a tabela 5, observa-se que para os maiores períodos de exposição (2 e 3 horas) há uma tendência de redução na taxa de sobrevivência dos explantes à medida que se aumenta a concentração de BAP.

As brotações observadas durante o experimento apresentaram características similares ao processo de multiplicação observado em outros experimentos com objetivo de multiplicação, ou seja, tufos contendo inúmeros brotos com poucas folhas e vigor

aparente. Na figura 5, pode-se observar os aspectos morfológicos que os explantes apresentaram em resposta aos tratamentos comparados ao grupo controle. Tufos com maior quantidade de brotos foram obtidos nos tratamentos T4 e T5. Concentrações mais elevadas e maior tempo de exposição mostraram-se prejudiciais para a qualidade e quantidade das brotações, como observado nos tratamentos T9, T10, T11 e T12. Sob tais condições verificou-se a oxidação do material vegetal, ausência de brotações tecidos necrosados e coloração escura (Figura 6). A manutenção das folhas nos explantes teve por finalidade proporcionar respostas organogênicas *in vitro*, por tratar-se de uma fonte endógena de hormônios para o explantes. Porém essas apresentaram-se enrugadas e sem vestígio de resposta morfogênica.



Figura 5 - Aspecto geral dos explantes cultivados em concentrações de BAP e tempo de exposição aos 21 dias de cultura *in vitro*. Com exceção do controle, cada duas plantas correspondem a um tratamento

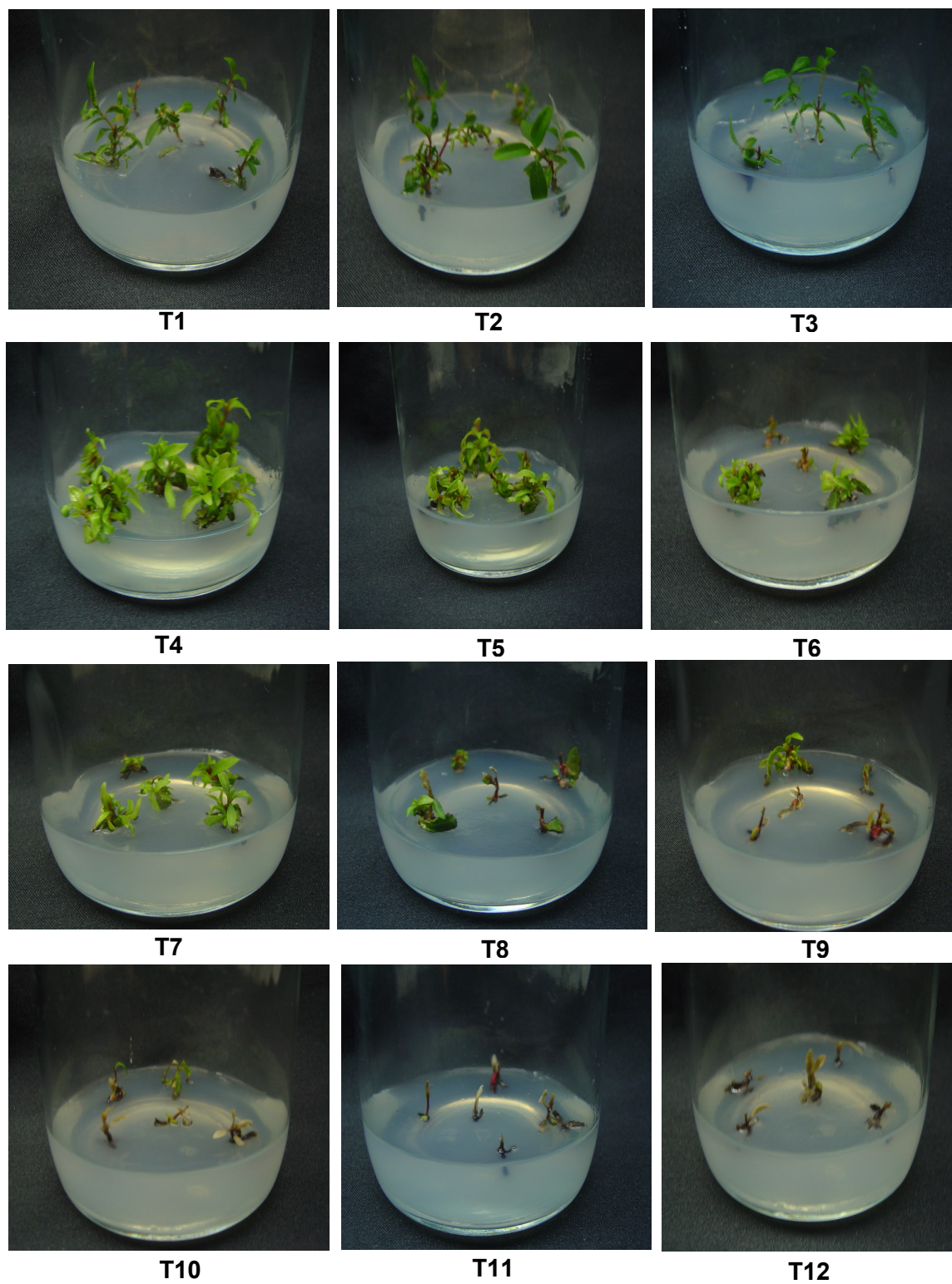


Figura 6 - Detalhe das brotações de *E. grandis* nos tratamentos aos 21 dias de cultura *in vitro*.

4.3 Taxa de multiplicação

Pela análise das interações entre concentrações de BAP e tempo de exposição verificou-se a existência de maior índice de brotações multiplicadas/explante dentro dos tratamentos de “pulse” com concentração de 200 mg.L⁻¹, quando comparados aos demais tratamentos do experimento. Na figura 7 observa-se que os tratamentos com a concentração de 200 mg L⁻¹ de BAP por 2 horas produziu 5,37 brotos por explante, constituindo assim a maior taxa de multiplicação seguido de 5,22 por 1 hora de exposição para a mesma concentração. Stokjicic e Budimir (2004), também atribuíram o valor de 4,6 brotos por explante desenvolvidos em cotilédones de *Pinus heldreichii*, à interação dos fatores BAP (50 mg L⁻¹) por 1 hora de exposição.

O fato dessas interações terem favorecido o aumento na taxa de multiplicação, pode estar relacionado com a função desse regulador de crescimento, ou seja, por se tratar de uma citocinina, e portanto, relacionada com a divisão celular, essa concentração fornecida aos explantes durante 1 e 2 horas favoreceu o desenvolvimento de gemas laterais.

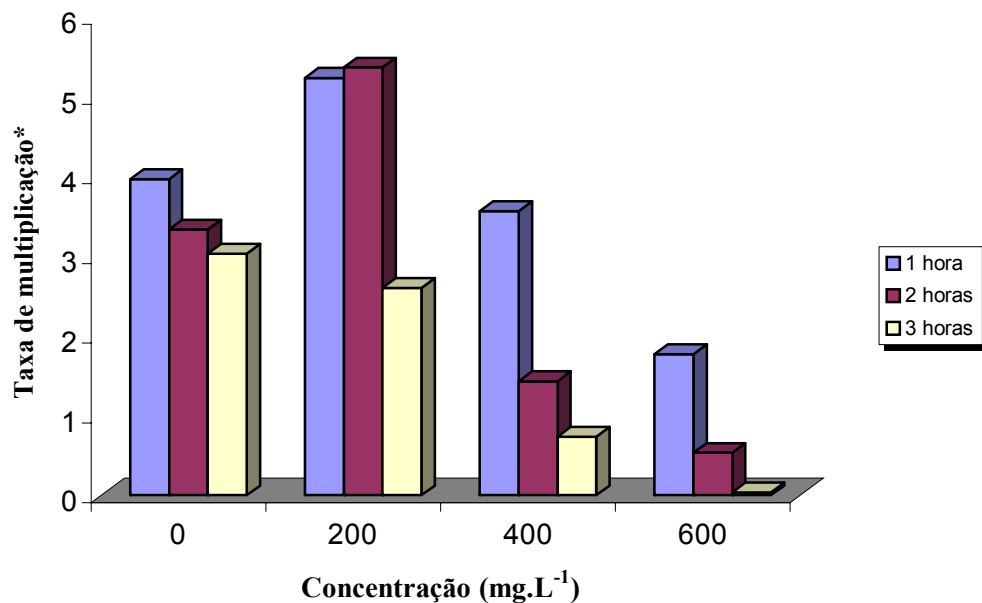


Figura 7 - Número médio de brotos/explante (*Taxa de multiplicação) de *E. grandis* em relação a concentrações de BAP e período de exposição aos 21 dias de cultura *in vitro*

Para o tratamento T1, isento de BAP, a taxa de multiplicação no tempo de exposição de 1 hora apresentou 3,97 brotos por explante. Esse valor médio foi estatisticamente maior quando comparado aos tratamentos compostos de 400 mg L⁻¹ por 2 horas (T8) e 3 horas (T9) de exposição com produção de 1,43 e 0,73 brotos/explante respectivamente. Nesses tratamentos nota-se que a interação entre os fatores concentração de BAP x tempo de exposição inibiu o desenvolvimento de brotações nos explantes. Diferentemente desse resultado, a mesma concentração de BAP (400 mg L⁻¹) durante 30 minutos promoveu uma capacidade de indução de 3.78 embriões por embrião de *Pinus wallichiana* em comparação ao controle usando somente água (MATHUR; NADGAUDA, 1999).

Para Drake et al. (1997), o método de “pulse” (400 mg L⁻¹ de BAP por 2 horas) 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*. Segundo VILLALOBOS-AMADOR et al. (2002) a ausência de auxina exógena para o processo organogênico não é limitante dependendo da espécie. A atividade fisiológica dos reguladores de crescimento não apenas depende do acréscimo de reguladores acrescentados ao meio, mas do nível endógeno ou da interação entre eles. O nível de auxina presente no tecido pode ser suficiente para estabelecer o balanço entre os reguladores de crescimento e desencadear respostas morfogenéticas. Isso corrobora com o observado em *E. grandis* apesar de se ter adicionado na solução de “pulse” 0,1 mg L⁻¹ de AIA, porém fixou-se a mesma concentração para todos os tratamentos evitando assim dúvida com relação ao efeito das concentrações de BAP e tempo de exposição. Outro fator a ser considerado é a hipótese de que a proliferação de brotos *in vitro* pode ser maximizada com o emprego de dois ou mais reguladores de crescimento (SKOOG, MILLER, 1957).

Ainda com relação a figura 6, nota-se que em todas as concentrações de BAP avaliadas nos tratamentos de “pulse”, houve um decréscimo na taxa de multiplicação com o aumento da concentração, e tempo de exposição chegando a 0,03 brotos por explante com 600 mg L⁻¹ de BAP em 3 horas de exposição. Isso mostra que a espécie *E. grandis* vem a ser pouco exigente quanto a dosagens crescentes de BAP em forma de “pulse” para multiplicação de brotações.

4.4 Produção de biomassa

A análise de variância dos resultados de massa fresca e seca dos explantes comprova o efeito dos tratamentos na produção de biomassa (figura 8). Através desses dados, pode-se avaliar a correspondência entre o crescimento *in vitro* dos explantes e a influência da velocidade de difusão e absorção de nutrientes em relação ao estímulo morfogenético. A maior produção de biomassa foi observada no tratamento com 200 mg L⁻¹ por 2 horas de exposição. Segundo Correia et al, (1995), os processos de difusão e absorção durante o cultivo em meio sólido podem ser prejudicados pelo agente geleificante (Agar) por este representar uma barreira aos processos de difusão e absorção de água reduzindo o crescimento das culturas.

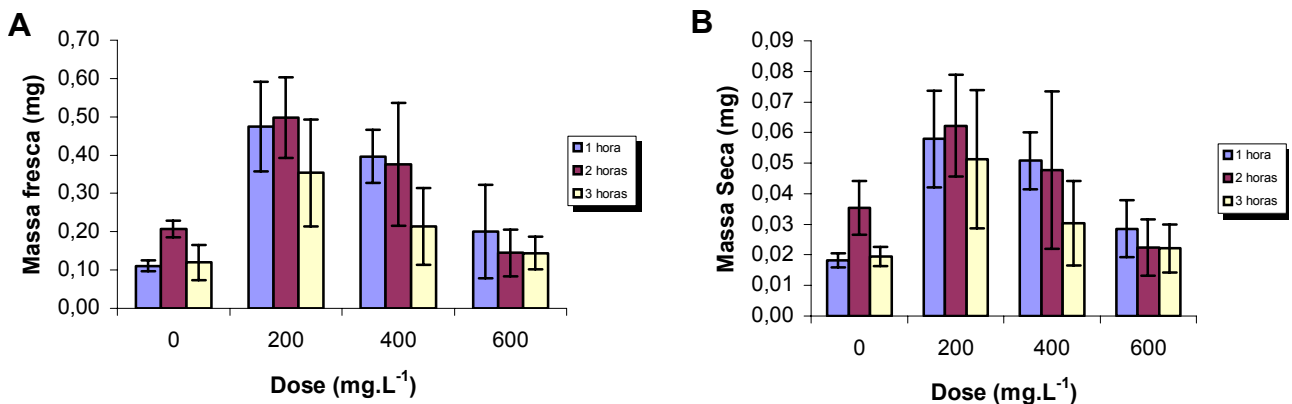


Figura 8 – Produção de biomassa de brotações de *E. grandis* aos 21 dias de cultivo *in vitro*. a) Massa fresca (mg); b) Massa seca

A absorção de água, sais minerais e açúcar do meio foram responsáveis pela produção dos brotos induzidos anteriormente pelo “pulse” uma vez que o meio de cultura sólido utilizado após o “pulse” era livre de reguladores de crescimento. O aumento da produção de biomassa foi crescente entre os tratamentos com 200 mg L⁻¹ de BAP durante 1 hora e 2 horas. Inúmeros trabalhos (STOKJICIC; BUDIMIR, 2004; TANG; NEWTON, 2005; MATHUR; NADGAUDA, 1999; DRAKE et al. 1997) relatam o efeito positivo do BAP na formação de brotos e alta taxa de multiplicação em sistemas

de micropropagação, essas variáveis representam diretamente a taxa de biomassa produzida.

Apesar de não haver literatura relacionando o efeito de “pulse” envolvendo o uso de BAP e tempo de exposição na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus* sp., a concentração de BAP e o tempo de exposição da solução de “pulse” foram fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento nesse sistema de produção.

4.5 Análise histológica

As análises histológicas concentraram-se nos tratamentos T4 e T5, por serem os tratamentos que melhor responderam à variável número de brotos, e também por apresentarem visível alteração morfológica da região basal, diferentemente dos demais tratamentos e da testemunha, como pode ser observado na figura 9. Nessa região, ocorreu a formação de centros meristemáticos, formados por células pequenas, isodiamétricas, com elevada relação núcleo plasmática (RNP), características de regiões meristemáticas com intensa atividade de divisão celular (Cutter, 1987).

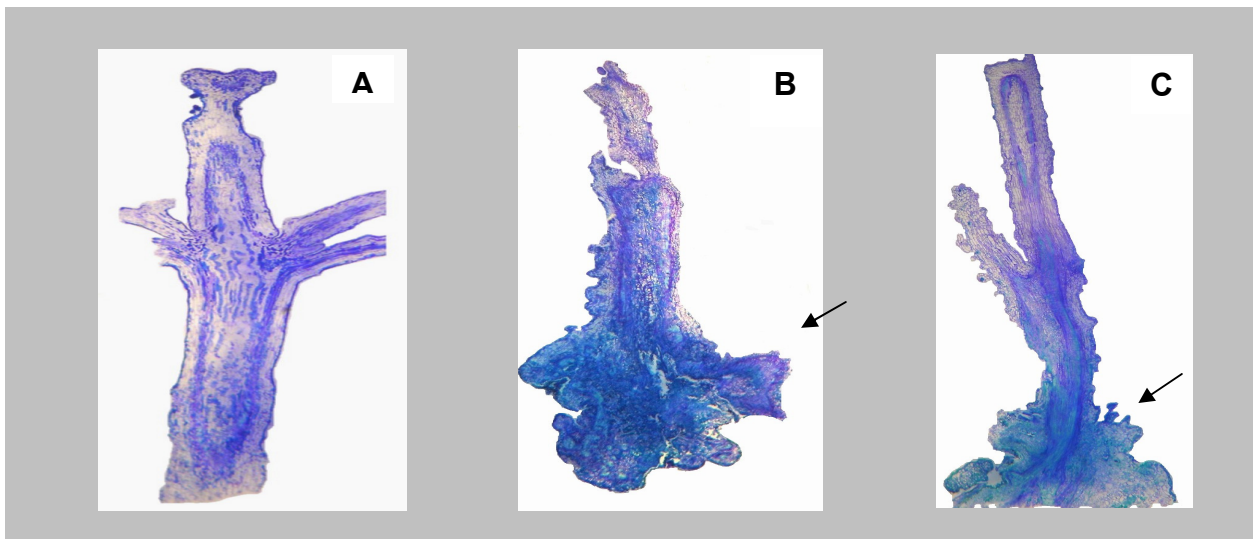


Figura 9 - Fotomicrografia em estereomicroscópio Micronal de cortes transversais dos explantes, destacando a diferença de resposta da região basal após 21 dias em cultura no tratamento a) testemunha, b) T4 e c) T5. Setas = região com elevada atividade meristemática. Barra = 500 μ m

Em conseqüência da formação dos centros meristemáticos, a região basal dos explantes sofreu completa desestruturação, alterando a composição dos tecidos internos, principalmente do parênquima cortical e do procâmbio, permitindo atribuir a esses tecidos, a principal capacidade de resposta morfogênica aos tratamentos. Segundo Hicks (1980), a competência celular para determinadas respostas morfogênicas *in vitro* pode ser intrínseca ao explante utilizado como é o caso do periciclo e a formação das raízes laterais, ou então induzida por meio de manipulações adequadas.

Nos explantes de *E. grandis* tratados apenas com água, tratamentos T1, T2 e T3 (testemunha) e para os demais tratamentos (T6, T7, T8, T9, T10, T11 e T12), nenhuma alteração morfológica foi observada, apresentando epiderme uniestratificada; parênquima cortical com quatro camadas de células ajustadas compactamente; xilema, floema e medula típicos, sem nenhuma alteração anatômica evidente e procâmbio com relativa atividade meristemática, responsável tanto pela diferenciação de elementos do xilema e do floema, como pelo reduzido número de brotos formados (Figura 10).

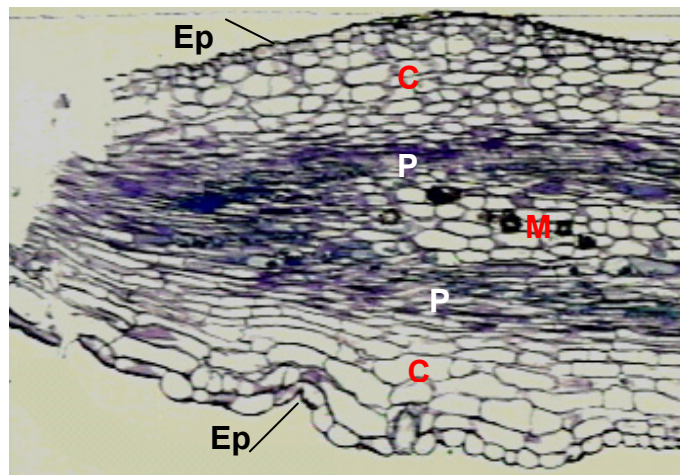


Figura 10 – Fotomicrografia em microscópio Zeiss do corte transversal da região basal do explante aos 21 dias de cultivo no tratamento T2. Ep = Epiderme; C = Córtex; P = Procâmbio e M = Medula

Entretanto para os explantes de *E. grandis* mantidos nos tratamentos T4 e T5 observou-se deformação por crescimento em espessura da região basal, e os maiores resultados obtidos para números de brotos de todo o experimento 35,17 (T4) e 32,17

(T5), o que pode ser comprovado pela análise histológica desse material, que evidencia as maiores alterações nas estruturas internas da região basal, comparados a testemunha, após o período de cultura *in vitro*, com maior atividade mitótica nos tecidos do parênquima cortical e do procâmbio, com a formação de diversos centros meristemáticos (meristemóides) (Figura 11) que provavelmente atuaram na formação das gemas adventícias, evidenciando a maior capacidade organogênica desses tecidos em resposta aos tratamentos.

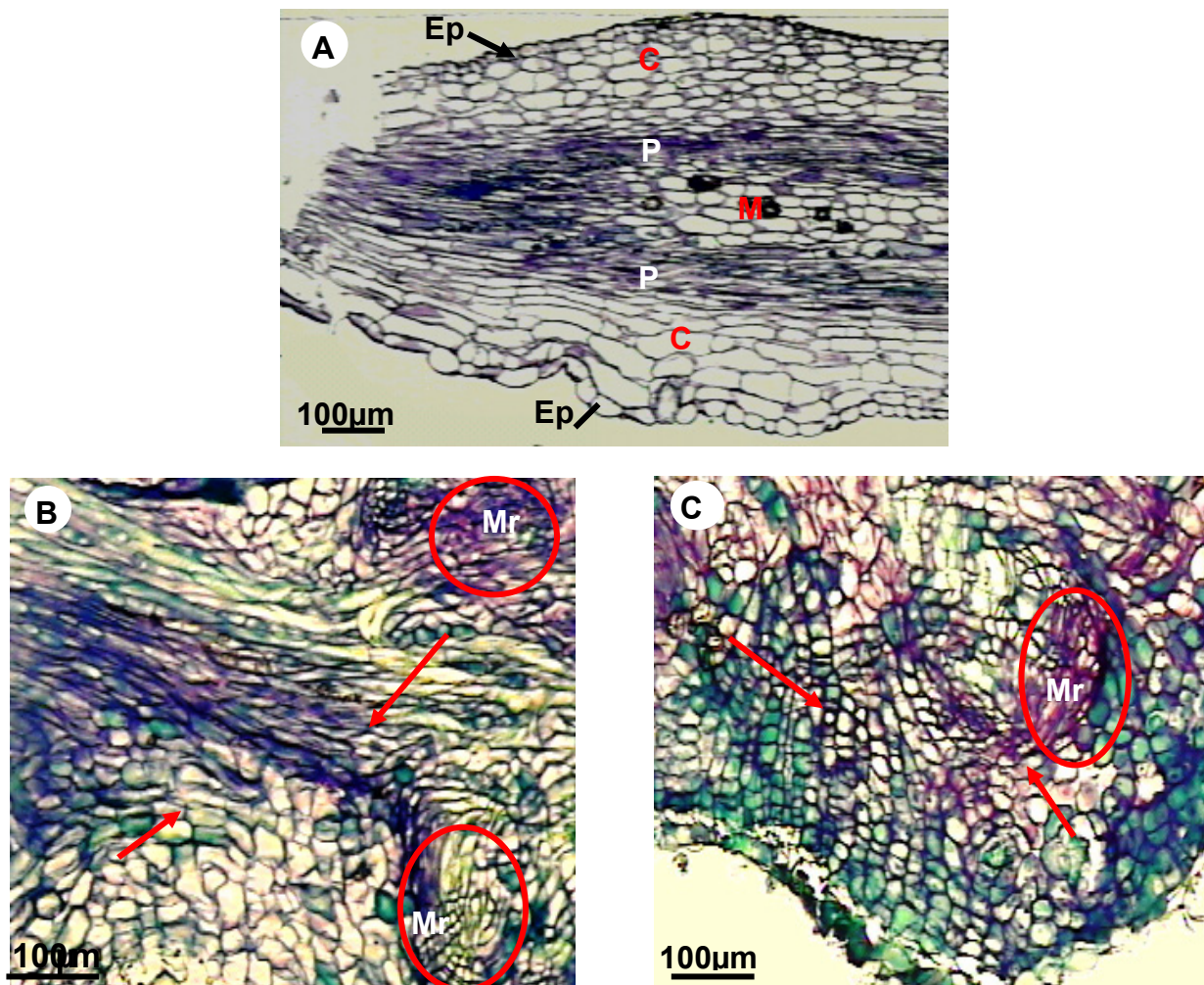


Figura 11 - Fotomicrografia em microscópio Zeiss do corte transversal da região basal do explante, destacando a formação de meristemóides, após cultivo por 21 dias em a) T2; b) T4 e c) T5. C = Córtex; P = procâmbio e Mr = Meristemóide. Setas = Região cortical com elevada atividade meristemática

Os resultados da análise histológica com *E. grandis* evidenciaram alterações da epiderme em algumas regiões do explante com maior intensidade mitótica nesse tecido formando pequenas protuberâncias nos tratamentos T4 e T5 na região da epiderme (Figura 12).

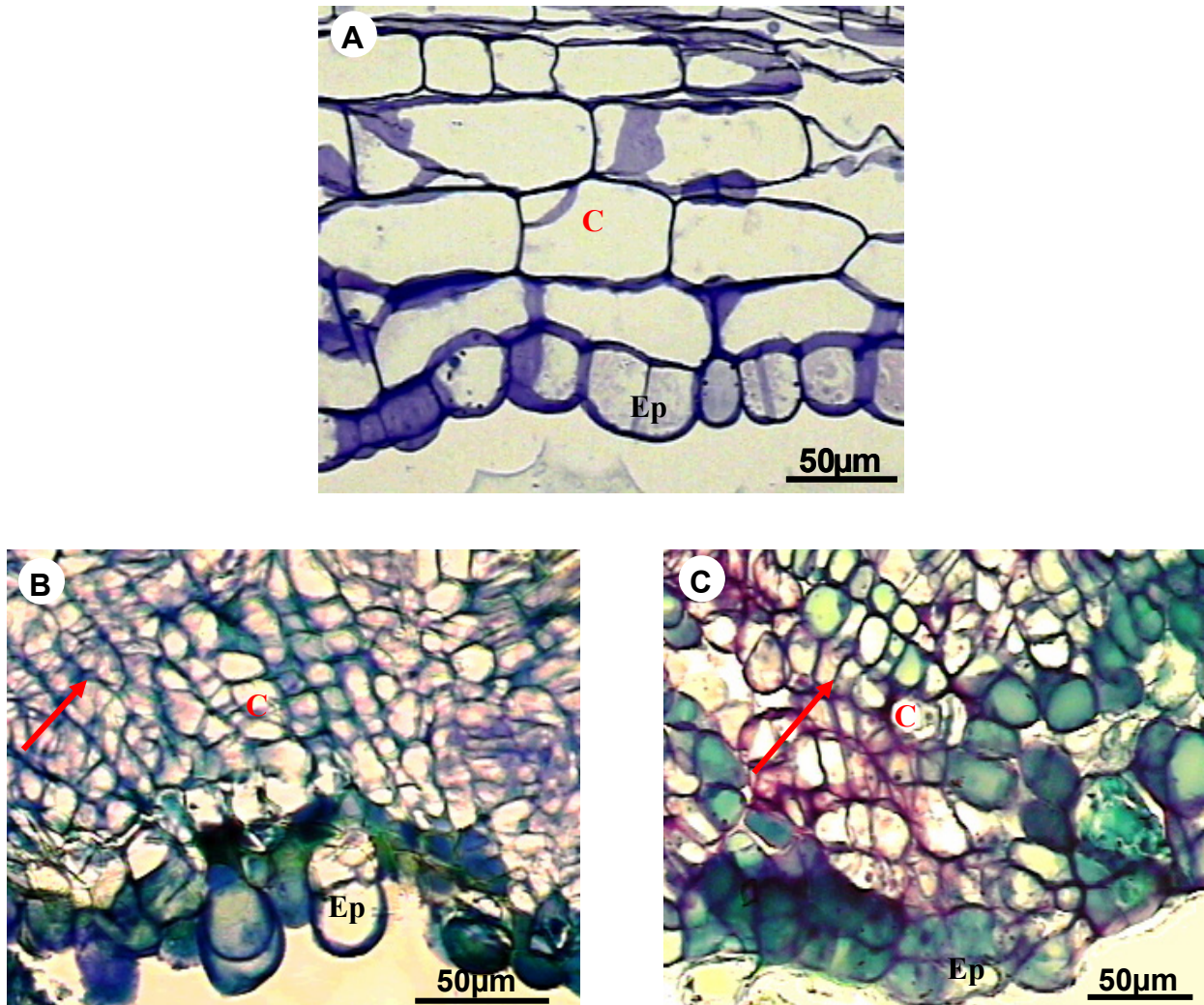


Figura 12 - Fotomicrografia em microscópio Zeiss do corte transversal da região basal das plântulas de *E. grandis* destacando a região da epiderme, após cultivo por 21 dias em a) T2 – sem alteração da epiderme e do córtex; b) T4 e c) T5. Ep = Epiderme; C = Córtex; Setas pretas = Protuberâncias epidérmicas e Setas vermelhas = Região cortical com elevada atividade meristemática

A formação dos brotos de *E. grandis* deu-se pelas células do parênquima da região basal do explante sendo evidenciada pela formação de meristemóides caracterizando o processo de organogênese direta. Nessa via de regeneração não ocorre a fase intermediária de calo e depende da natureza do órgão e do genótipo do qual o explante foi extraído (THORPE, 1995 citado por GUIDOLIN, 2003). Segundo Alves (1999) esses meristemóides resultam da desdiferenciação das células do córtex que passam a se dividir ativamente, com o desenvolvimento, suas células acabam adquirindo citoplasma denso que pode sofrer alongamento e levar a formação de primórdios de gemas.

Nadgauda e Mathur (1999) estudaram a regeneração *in vitro* por organogênese direta a partir de embriões zigóticos de *Pinus wallichiana* induzidos por solução de “pulse” com 2,5 µm de BAP e através de estudos histológicos, verificaram que a origem das brotações era da superfície da massa embriogênica e que essas apresentavam conexão vascular com o explante. Resultado semelhante também ocorreu em cotilédones de *Abies amabilis* cultivados durante sete dias em meio de cultura na presença de BAP onde foi observado o desenvolvimento de meristemóides na região sub-epidérmica (KULCHETSKI et al. 1995).

A figura 13-A mostra a região basal das plântulas de *E. grandis* da evidenciando a região do parênquima cortical bastante ativo com inúmeras camadas de células com formatos variados e sem padrão de divisão definido e o procâmbio também ativo com a diferenciação em elementos do xilema e floema, porém em ambos sem a formação de meristemóides, para o material cultivado no tratamento T2, com igual resultados para os demais tratamentos (T1, T3, T6, T7, T8, T9, T10, T11 e T12), enquanto que o material cultivado em T4 e T5 além de apresentar elevada atividade meristemática, também apresentou o desenvolvimento de meristemóides (Figura 13-B).

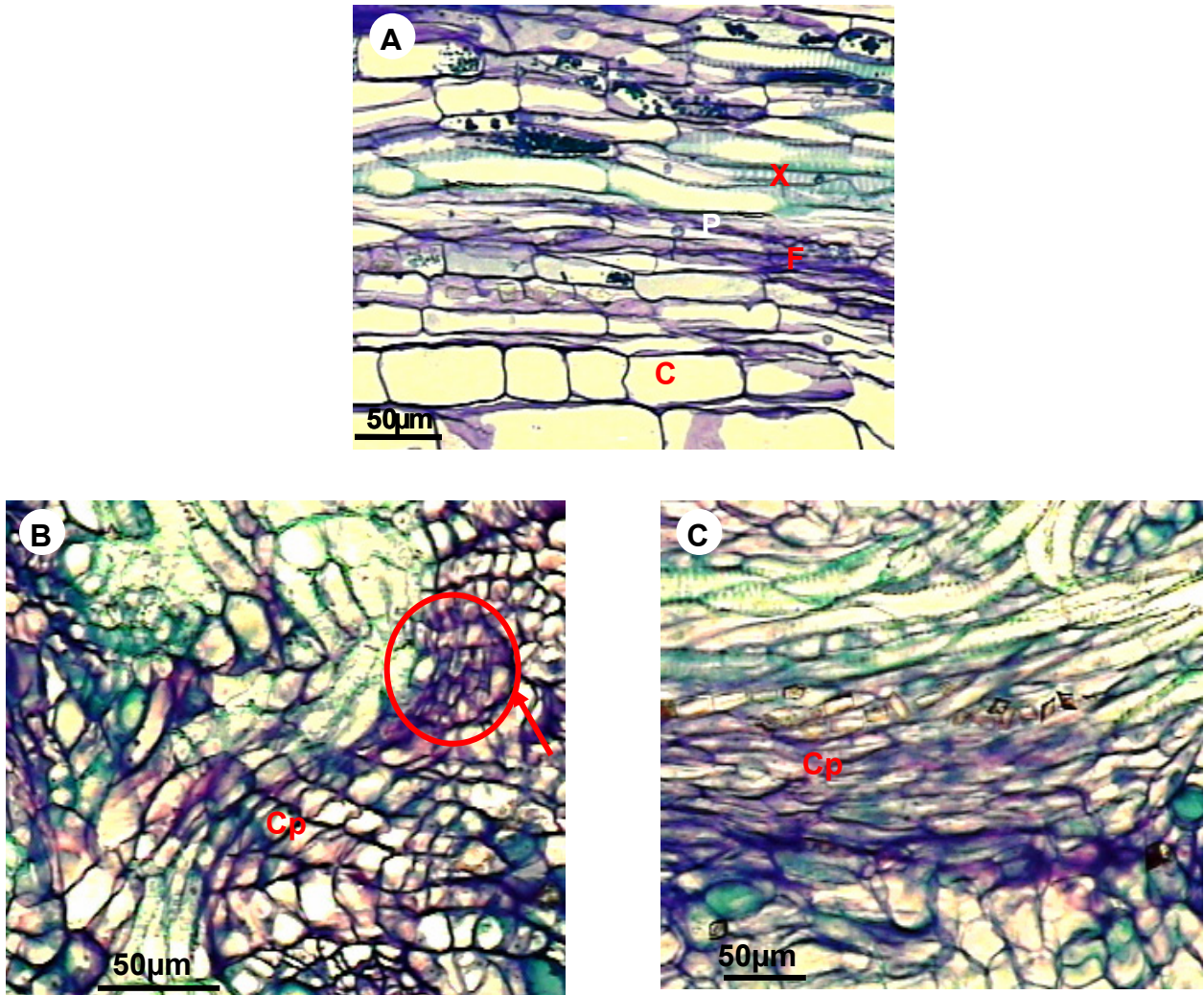


Figura 13 - Fotomicrografia em microscópio Zeiss do corte transversal da região basal do explante, destacando a região do procâmbio, após cultivo por 21 dias em a) T2; b) T4 e c) T5. C = Córtex; P = Procâmbio; Cp = cordão de procâmbio; X = Xilema e F = Floema. Seta = Meristemóides

5 CONCLUSÕES

1. A concentração 200 mg L⁻¹ de BAP durante 1 e 2 horas de exposição foi eficiente na multiplicação “in vitro” de *E. grandis*, induzindo a divisão celular no parênquima cortical e procâmbio representada pelo surgimento de meristemóides;
2. O pH não apresentou interação entre os demais fatores do “pulse”;
3. As concentrações 400 e 600 mg L⁻¹ de BAP expostas aos explantes em “pulse” apresentaram-se tóxicas;
4. O tempo superior a 2 horas mostrou-se negativo para a resposta morfogénica;
5. O uso de “pulse” representa uma alternativa viável na redução de tempo e gastos para a micropropagação de *E. grandis*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* (palmae) through flower bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 8, n. 3, p. 215-217, 1996.

ALVES, A.C. **Estudos anatômicos da organogênese *in vitro* de soja e otimização do processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens***. 1999. 101 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

AMERSON, H.V.; FRAPTOM, L.Jr.; MOTT, R.L.; SPAINE, P.C. Tissue culture of conifers using loblolly pine as a model. In: HANOVER, J.; KEATHLEY, D. **Genetic manipulation of woody plants**. New York: Plenum, 1987. p.117-137.

ANDRADE, E.N. **O eucalipto**. 2.ed. São Paulo: EDUSP, 1961. 667 p.

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.

BECWAR, M.R.; PULLMAN, G.S. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. **Somatic embryogenesis in woody plants**. Boston, v. 3, p. 287-301, 1995.

BENNETT, I.J.; McDAVID, D.A. J.; McCOMB, J.A. The influence of amonium nitrate, pH and índole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalptos glóbulos*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 3, p. 355-360, 2003.

BENNETT, I.J.; McCOMB, J.A.;TONKINI C.M.; McDAVID, D.A.J. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globules* Labill. **Annals of Botany**, London, v. 74, p. 53-58, 1994.

BLAKESLEY, D. Update and metabolism of 6-benzyladenine in shoot cultures of *Musa* and *Rhododendron*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, p. 69-74, 1991.

BLOMSTEDT, C.; CAMERON, C; WHITEMAN, P; CHANDELER, S.F. Micropropagation of juvenile *Eucalyptus regnans* (Mountain Ash.). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 39, p. 179-86, 1991.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, Piracicaba, n. 48/49, p.107-116, 1995

CUTTER, E.G. **Anatomia vegetal**. Pt.2: Órgãos, experimentos e interpretações. São Paulo: Roca, 1987. 336 p.

DAS, D.K.; PRAKASH, N,S.; BHALLA-SARIN, N. Multiple shoot induction and plant regeneration in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, p. 691-695, 1999.

DEORA, N. S.; SHEKAWAT, N. S. Micropropagation of *Capparis decidua* (Forsk.) Edgew. - a tree of arid horticulture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, p. 278-281, 1995.

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.

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

FLYGHT, 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.

FONTES, A.M. **Clonagem de *Eucalyptus* utilizando a técnica de miniestaquia**. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/bioano01/div38.htm>. Acesso em: 10 set. 2005.

GUIDOLIN, A.F. **Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium***. 2003. 113 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GUPTA, P.K.; DURZAN, D. J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga manziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 4, p. 177-179, 1985.

HICKS, G.S. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. **Botanical Review**, New York, v. 46, p. 1-23, 1980.

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

JAIN, S.M.; DONG, N.; NEWTON, R.J. Somatic embryogenesis in Slash pine (*Pinus elliottii*) from immature embryos cultured *in vitro*. **Plant Science**, Limerick, v. 65, p. 233-241, 1989.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 1, p. 137-138, 1965.

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

KULCHETSCHIK, L.; HARRY, I.S.; YEUNG, E.C.; THORPE, T.A. *In vitro* regeneration of Pacific Silver fir. (*Abies amabilis*) plantlets and histological analysis of shoot formation. **Tree Physiology**, Victoria, v. 15, p. 727-738, 1995.

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

MacRAE, S.; STADEN, J. van. *In vitro* culture of *Eucalyptus grandis* – effect of gelling agents on propagation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 137, p. 249-251, 1990.

MALABADI, R. B.; van STADEN, J. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 25, p. 11-16, 2005.

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.

MEHRA-PALTA, A.; SMELTLER, R. H. Hormonal control of induced organogenesis. **TAPPI Journal**, Atlanta, v. 61, n. 1, p. 37-40, 1978.

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.

MONCALEÁN, P.; ALONSO, P.; CENTENO, M.L.; CORTIZO, M.; RODRÍGUEZ,; FERNÁNDEZ, B.; ORDÁS, R.J. Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. **Tree Physiology**, Victoria, v. 25, p. 1-9, 2005.

MOTT, R.L.; AMERSON, H. V. A tissue culture process for the clonal production of loblolly plantlets. **Technical Bulletin**, North Carolina Agricultural Research Service, Raleigh, n. 271, p. 3-14, 1981.

MOURA, V.P.; GUIMARÃES, D. P. **Produção de mudas de *Eucalyptus* para o estabelecimento de plantios florestais**. Brasília: CENARGEM, 2003. 9 p. (Comunicado Técnico, 85).

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Lavras, UFLA, 2001. 92 p.

PHILLIPS, G.C. *In vitro* morphogenesis in plants - recent advances. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Gaithersburg, v. 40, p. 342-345, 2004.

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

PULLMAN, G.S.; MONTELLO, P.; CAIRNEY, J.; XU, N.; FENG, X. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: maturation improvements by metal analyses of zygotic and somatic embryos. **Plant Science**, Atlanta, v. 164, p. 955-969, 2003.

PUROHIT, S.D.; SINGHVI, A. Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 76, p. 219-229, 1998.

SCHESTIBRATOV, K.A.; MIKHAILOV, R. V.; DOLGOV, S. V. Plantlet regeneration from subculturable radular callus of *Pinus radiata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, p. 139-146, 2003.

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.

SITA, G.L.; RANI, B.S. *In vitro* propagation of *Eucalyptus grandis* L. by tissue culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 4, p. 63-65, 1985.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-130, 1957.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. Disponível em:
<<http://www.sbs.org.br/>>. Acesso em: 26 de out. 2005.

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

BUDIMIR, S; STOJICIC, D. Cytokinin-mediated axillary shoot formation in *Pinus heldreichii*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 48, n. 3, p. 477-479, 2004.

SUBBAIAH, M.M.; MINOCHA, S. C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 370-373, 1990.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2. p. 61-64, 1999.

SUL, III-W.; KORBAN, S. S. Effects of salt formulations, carbon sources, cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus pinea* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 43, p. 197-205, 2004.

TANG, W. In vitro regeneration of loblolly pine and random amplified polymorphic DNA analyses of regenerated plantlets. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 163-168, 2001.

TANG, W.; NEWTON, R.J. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia Pine (*Pinus virginiana* Mill.). **Plant Science**, Limerick, v. 167, p. 621-628, 2004.

TANG, W.; NEWTON, R.J. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobes* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.24, p. 1-9, 2005.

TANG, W.; OUYANG, F.; GUO, Z. - c. Plant regeneration through organogenesis from callus induced from mature zygotic embryos of loblolly pine. **Plant Cell Reports**, Victoria, v. 17, p. 557-560, 1998.

TANG, W.; HARRIS, L.C.; OUTHAVONG, V.; NEWTON, R.J. The effect of different plant growth regulators on adventitious shoot formation from (*Pinus virginiana*) zygotic embryo explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 78, p. 237-240, 2004.

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

VILLALOBOS-AMADOR, E.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDES, G.; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. Organogenesis and Agrobacterium rhizogenes-induced rooting in *Pinus maximartinezii* and *Pinus pinceana* Gordon. **Plant Cell Reports**, Victoria, v. 20, p. 779-785, 2002.

WARRAG, E.; LESNEY, M.S.; ROCKWOOD, D.J. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, p. 586-589, 1991.

XAVIER, A.; COMÉRCIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Árvore**, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.