

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

ELIAS TERRA WERNER

**CALOGÊNESE DE PAU-BRASIL (*Caesalpinia
echinata* Lam.-Fabaceae) *in vitro* VISANDO A
OBTENÇÃO DE UM BANCO DE GERMOPLASMA**

VITÓRIA

2009

ELIAS TERRA WERNER

**CALOGÊNESE DE PAU-BRASIL (*Caesalpinia
echinata* Lam.-Fabaceae) *in vitro* VISANDO A
OBTENÇÃO DE UM BANCO DE GERMOPLASMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE em BIOLOGIA VEGETAL na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol.

Co-orientador: Prof.(a) Dr.(a) Camilla Rozindo Dias Milanez.

VITÓRIA

2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

W492c Werner, Elias Terra, 1983-
Calogênese de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.-
fabaceae) *in vitro* visando a obtenção de um banco de
germoplasma / Elias Terra Werner. – 2009.
98 f. : il.

Orientador: Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol.
Co-Orientadora: Camilla Rozindo Dias Milanez.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. *Caesalpinia echinata*. 2. Calogênese. 3. Meios de cultura
(Biologia). 4. Nitrogênio. 5. Reguladores de crescimento. 6.
Germoplasma vegetal. I. Cuzzuol, Geraldo Rogério Faustini. II.
Milanez, Camilla Rozindo Dias. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV.
Título.

CDU: 57

ELIAS TERRA WERNER

**CALOGÊNESE DE PAU-BRASIL (*Caesalpinia echinata*
Lam.-Fabaceae) *in vitro* VISANDO A OBTENÇÃO DE UM
BANCO DE GERMOPLASMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção de título de MESTRE em BIOLOGIA VEGETAL na área de concentração Fisiologia Vegetal, sob orientação do Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. GERALDO ROGÉRIO FAUSTINI CUZZUOL

Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

PROF.^a DR.^a CAMILLA ROZINDO DIAS MILANEZ

Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientador

DR. APARECIDA GOMES DE ARAÚJO

Universidade Federal de Lavras - MG
Membro Titular (Externo)

PROF.^a DR.^a MARIA DO CARMO PIMENTEL BATITUCCI

Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Titular (Interno)

Dedico a todos que tornaram este trabalho possível, por terem me ajudado a enfrentar as dificuldades com serenidade e otimismo. A minha família, pelo apoio, amizade, palavras de incentivo e minha educação, minha maior herança.

Agradecimentos

A Deus, pela constante presença em minha vida.

A meus pais, Helmo e Reneida, pelo incentivo e compreensão.

A minha irmã, Letícia Werner, pelo apoio e correção ortográfica.

A minha Família, por acreditar neste ideal, pois sei que tudo na vida pode passar, porém família sempre existirá.

Ao Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol pela orientação, incentivo, ensinamentos na realização deste trabalho, disponibilidade e paciência.

A todos os meus amigos que colaboraram, pelo constante auxílio e sugestões durante toda a realização do trabalho. Pela atenção e amizade. Gostaria de registrar toda a minha admiração por vocês.

A turma do MESTRADO EM BIOLOGIA VEGETAL 2007 e 2008, pelas lutas, diversões, alegrias, tristezas, mas com vitórias. Vocês todos fazem parte desta realidade.

A Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de realizar este trabalho e possibilitar a conclusão desta pós-graduação.

Ao Departamento de Ciências Biológicas – Setor Botânica, pela concessão ao uso dos laboratórios, equipamentos e materiais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, pelos ensinamentos adquiridos e apoio teórico e prático.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, coordenado pelo Prof. Dr. Moacir Pasqual, pelos ensinamentos práticos, teóricos e levantamento bibliográfico, a todos mostro minha total satisfação em tê-los conhecidos e hoje admirá-los.

Aos componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol, Prof. Dr. Moacir Pasqual e Prof.^ª Dr.^ª Maria Do Carmo Batitucci, a todos o meu muito obrigado pelas sugestões e contribuições para melhoria deste trabalho.

Em especial a co-orientadora, Prof.(a) Dr. (a) Camilla Rozindo Dias Milanez, por toda dedicação incondicional na parte histológica e revisão deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para concretização de mais uma etapa da minha formação, meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADO A TODOS!!!

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isto, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO GERAL	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE.....	21
2.2 ASPECTOS ECOLÓGICOS.....	26
2.3 DISTRIBUIÇÃO.....	27
2.4 ASPECTOS ECONÔMICOS.....	28
2.5 PRESERVAÇÃO.....	29
2.6 PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i>	30
2.7 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA.....	33
2.8 FONTE DE EXPLANTE.....	37
2.9 MEIOS DE CULTURA.....	38
2.10 FONTES DE NITROGÊNIO NO CULTIVO <i>IN VITRO</i>	40
2.11 REGULADORES DE CRESCIMENTO.....	41
3. OBJETIVO GERAL.....	44
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ARTIGO I: Controle da calogênese do pau-brasil <i>in vitro</i>	52
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
1. INTRODUÇÃO.....	55

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	56
2.2 INDUÇÃO DA CALOGÊNESE.....	56
2.3 ANTIOXIDANTES.....	57
2.4 INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	57
2.5 ORGANOGÊNESE DIRETA.....	57
3. RESULTADOS.....	58
4. DISCUSSÃO.....	59
5. CONCLUSÕES.....	61
6. AGRADECIMENTOS.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	62
8. FIGURAS E TABELAS.....	66

ARTIGO II: Meios de cultura, fontes nitrogenadas e reguladores de crescimento na calogênese de pau-brasil <i>in vitro</i>	70
RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	72
INTRODUÇÃO.....	73
MATERIAL E MÉTODOS.....	74
INDUÇÃO DA CALOGÊNESE.....	74
INFLUÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA.....	75
INFLUÊNCIA DE FONTES DE NITROGÊNIO.....	76
EFEITO DE AUXINAS E CITOCININAS.....	76
ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	77
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
RESULTADOS.....	78
DISCUSSÃO.....	80
AGRADECIMENTOS.....	85
REFERÊNCIAS.....	85
FIGURAS E TABELAS.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto geral da árvore de <i>Caesalpinia echinata</i>	22
Figura 2 - Acúleos presentes em <i>Caesalpinia echinata</i>	23
Figura 3 - Aspecto da flor e da inflorescência de <i>Caesalpinia echinata</i>	23
Figura 4 - Aspecto do fruto de <i>Caesalpinia echinata</i>	24
Figura 5 - Aspecto da semente de <i>Caesalpinia echinata</i>	24
Figura 6 - Aspecto da folha de <i>Caesalpinia echinata</i>	24
Figura 7 - Aspecto das diferentes folhas dos 3 morfotipos de <i>Caesalpinia echinata</i>	25
Figura 8 - Áreas remanescentes de pau-brasil.....	27
Figura 9 - Aspecto do tronco e da madeira de <i>Caesalpinia echinata</i>	28
Figura 10 – Esquema da competência organogênica.....	31
Figura 11 - Aspecto de Calos de <i>Narcissus tazetta</i> L. var. <i>chinensis</i>	35
Figura 12 - Complexos celulares pró-embriogênicos (PEMs) de Caquizeiro.....	36

Artigo I

Figura 1 - Aspectos morfológicos dos foliólolos juvenis (A), jovens (B) e adultos (C) de *C. echinata* utilizados como fonte de explantes e níveis de oxidação baixa (D), média (E) e alta (F) dos foliólolos cultivados *in vitro* no meio de cultura MS. Calos apresentando estruturas filamentosas (G), massas pró-embriogênicas – MPE (H) e embrião somático (ES) do tipo torpedo (I). Ápice meristemático aos 7 (J), 20 (K), 30 (L) e 60 dias (M) de cultivo *in vitro*.....

66

Figura 2 - Porcentagem de calos formados de discos de foliólolos jovens, juvenis e adulto de *C. echinata* cultivados na luz e escuro constante aos 56 dias de cultivo em meio MS com 0, 5, 10, 20, 50 e 100 mg/L de 2,4-D.....

67

Figura 3 - Porcentagem de oxidação dos discos de foliólolos jovens de *C. echinata* cultivados na luz e escuro constante e porcentagem de calos formados aos 56 dias de cultivo em meio MS com 10 mg/L 2,4-D e 2,0 mg/L de 6-BAP e suplementado com 150 mg/L ácido ascórbico, 150 mg/L ácido cítrico e 2 g/L carvão ativado.....

67

Figura 4 - Porcentagem de calos formados de discos de foliólolos jovens de *C. echinata* cultivados na luz e escuro constante aos 56 dias de cultivo em meio MS com 10 mg/L 2,4-D e

2,0 mg/L de 6-BAP suplementado com 150 mg/L ácido ascórbico, 150 mg/L ácido cítrico e 2 g/L carvão ativado.....68

Artigo II

Figura 1 - Massa fresca de calos de *Caesalpinia echinata* tratados com diferentes meios de cultura por 60 dias.....95

Figura 2 - Massa fresca de calos de *C. echinata* tratados com diferentes fontes de nitrogênio aos 60 dias.....96

Figura 3 - Massa fresca de calos de *C. echinata* tratados com diferentes interações entre auxinas e citocininas por 60 dias97

Figura 4-9 - Aspectos morfológicos e histológicos da calogênese de *C. echinata in vitro*.....98

LISTA DE TABELAS

Artigo I

Tabela 1 - Porcentagem de calos formados utilizando-se discos de foliólolos juvenil, jovem e maduro de desenvolvimento de *C. echinata* inoculados em meio MS contendo 0, 5, 10, 20, 50 e 100 mg/L de 2,4-D após 56 dias de cultivo.....68

Tabela 2- Porcentagem da coloração dos calos de *C. echinata* aos 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com 2,4-D e 6-BAP e 30 dias pós a transferência para meio MS com 2,4-D reduzido à 25% valor inicial e 6-BAP reduzido à 10% do valor inicial.....69

Artigo II

Tabela 1 - Massa seca (mg) de calos de pau-brasil inoculados em diferentes meios de cultura aos 60 dias.....93

Tabela 2 - Massa seca (mg) de calos de pau-brasil inoculados em diferentes fontes de nitrogênio aos 60 dias.....93

Tabela 3 - Massa seca (mg) de calos de pau-brasil inoculados em diferentes interações entre auxinas e citocininas aos 60 dias94

RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de estudar a calogênese de *C. echinata in vitro*, pela obtenção de calo, e o controle desse processo, testando-se diferentes meios de cultura, fontes de nitrogênio e interação entre auxinas e citocininas, com a finalidade de regeneração e conservação da espécie. A indução da calogênese é a primeira etapa, em que foram usados discos de foliólulos do pau-brasil em diferentes fases de desenvolvimento (juvenis, jovem e adulto) combinados com 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) (0, 5, 10, 20, 50, 100 mg/L) e 6-benzilaminopurina (6-BAP) (2,0 mg/L) cultivados em meio de cultura MS. Foliólulos juvenis cultivados com concentração de 2,4-D de 5 a 20 mg/L e foliólulos jovens tratados com 50 e 100 mg/L 2,4-D geraram calos sem diferenças significativas entre luz e escuro. A transferência de calos do meio MS com 5,0, 10,0 e 20,0 mg/L de 2,4-D para meio sem fitorreguladores estimulou a formação de massas pró-embriônicas (MPEs). Os meios livres de fitorreguladores, 2,0 mg/L de 2,4-D e 0,5 mg/L de 2,4-D elevou o número de calos embriogênicos e de massas pré-embriônicas. Somente em 0,5 mg/L 2,4-D verificou-se algumas estruturas semelhantes à embriões somáticos na fase globular e codiforme. Testou-se também diferentes antioxidantes (ácido cítrico, ácido ascórbico e carvão ativado) nos foliólulos jovens de pau-brasil, com intuito de controlar a oxidação desses explantes. Os melhores resultados foram proporcionados pelo carvão ativado, porém, inibitório à calogênese. Avaliou ainda a resposta no crescimento de calos de pau-brasil sob influência de diferentes meios de cultura (MS, B5, White e WPM), de fontes nitrogenadas e suas interações (NH_4NO_3 , KNO_3 e glutamina) e a interação entre auxinas (2,4-D, AIA e AIB) e citocininas (BAP e KIN). Os explantes utilizados para estes testes foram calos de pau-brasil, induzidos a partir de foliólulos juvenis, inoculados em meio de MS suplementado com 20 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D). Fragmentos de aproximadamente 0,1g de massa fresca foram utilizados para a análise dos diferentes meios de cultura, efeitos dos compostos nitrogenados e a interação de auxinas e citocininas. As análises de massa fresca foram realizadas nos experimentos aos 30 e 60 dias após a inoculação. No final de cada experimento (60 dias) determinou-se a massa seca. Com relação aos meios testados, MS, B5 e White não diferenciaram entre si estatisticamente. No entanto, o meio WPM apresentou valores significativamente diferente em relação aos outros 3 meios (MS, B5, White). Nas fontes de nitrogênio testadas e suas interações, o tratamento tendo como única fonte o NH_4NO_3 estimulou melhores resultados aos 60 dias de cultivo. A interação entre auxinas e citocininas, de modo geral, não houve diferença estatística entre os tratamentos. No entanto, os

tratamentos com 2,4-D foram os que possibilitaram maior produção de massa fresca dos calos sendo a concentração de 0,5 mg/L de 2,4-D associada a 5,0 mg/L BAP proporcionou melhor resultado. Realizou-se análise histológica nos calos, mostrando que não houve a formação de embriões somáticos nos calos de pau-brasil. Porém, verificou-se que a calogênese em pau-brasil ocorre na superfície adaxial dos foliólulos, resultado da proliferação das células do parênquima clorofiliano. Os calos apresentaram coloração variando do amarelo escuro a marrom, mostrando aspecto friável, não embriogênico, e com acúmulo de conteúdo fenólico. Observou-se ainda a presença de áreas meristemáticas (meristemóides), mostrando que calos de pau-brasil são competentes, embora não embriogênicos.

Palavras-chaves: *Caesalpinia echinata*, calogênese, meios de cultura, nitrogênio, reguladores de crescimento.

ABSTRACT

This work was carried out in order to study the callogenesis of *C. echinata in vitro*, through callus production, and the control of this process, by testing different culture media, sources of nitrogen and interaction between auxins and cytokinins, aiming the regeneration and conservation of the species. The induction of callus is the first step, in which leaf disks of brazilwood were used at different stages of development (juvenile, young and adult) combined with the growth regulators 2,4-D (0, 5, 10, 20, 50, 100 mg/L) and 6-BAP (2.0 mg/L) cultivated in MS culture medium. Juveniles leaves cultivated with low concentration of 2,4-D (5 and 20 mg/L) and young leaves treated with high concentrations of 2,4-D (50 and 100 mg/L) produced callus without significant differences between light and dark. The transfer of callus from MS culture medium with high concentrations of 2,4-D (5.0, 10.0 and 20.0 mg/L) to medium without growth regulators stimulated the formation of pro-embryonic masses (PEMs). Media free of growth regulators, 2.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L 2,4-D increased the number of embryogenic callus and pre-embryonic masses. Only on 0.5 mg/L 2,4-D structures similar to somatic embryos in globular stage and codiforme were observed. Different antioxidants were also tested (citric acid, ascorbic acid and activated charcoal) on young leaves of brazilwood in order to control the oxidation of the explants. The best results were provided by activated charcoal, however, inhibitory to callus. Response in growth of calluses of brazilwood was evaluated under the influence of different culture media (MS, B5, WPM and White), of different nitrogen sources and their interactions (NH_4NO_3 , KNO_3 and glutamine) and the interaction between auxins (2,4-D, IAA and IBA) and cytokinins (BAP and KIN). The explants used for these tests were callus of brazilwood, induced from juveniles leaves, inoculated in MS medium supplemented with 20 mg/L of 2,4-D. Fragments of approximately 0.1 g of fresh weight were used for the analysis of different culture media, effects of nitrogen compounds and the interaction of auxins and cytokinins. The analysis of fresh weight, on the experiments, were performed at 30 and 60 days after inoculation. At the end of each experiment (60 days) dry weight was determined. Regarding the media tested, MS, B5 and White did not differ statistically. However, the WPM media showed significantly different values compared to the other 3 media (MS, B5, White). As for the sources of nitrogen tested and their interactions, the treatment with a single source, NH_4NO_3 , stimulated the best results after 60 days in culture. The interaction between auxins and cytokinin, in general, did not present statistical difference between treatments. However, treatments containing 2,4-D were the ones who produced callus with the highest fresh weight, in which the concentration of

0.5 mg/L 2,4-D combined with 5.0 mg/L BAP gave better results. Histological analysis were carried out on callus, indicating that the formation of somatic embryos occurred in callus of brazilwood. However, it was found that the callogenesis in brazilwood occurs on the adaxial surface of the leaf, as a result of proliferation of parenchymal cells. The callus showed colors ranging from dark yellow to brown, showing a friable aspect, not embryogenic, and accumulation of phenolic content. It was also observed the presence of meristematic areas (meristemoids), showing that callus of brazilwood were competent, but not embryogenic.

Key Words: *Caesalpinia echinata*, callogenesis, culture media, nitrogen, growth regulators.

1- INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, com aproximadamente 23% das espécies de plantas. Estas espécies encontram-se distribuídas em seis grandes biomas: Floresta Amazônica, Cerrado, Caatinga, Floresta Atlântica, Pantanal Mato-Grossense e Pradarias de campo limpo (NOGUEIRA, 2003).

A Floresta Atlântica é um bioma de grande complexidade biológica e foi considerado pela União Internacional para Conservação da Natureza como um dos mais ameaçados do mundo (IUCN, 1986). Antes da colonização, este bioma se estendia pela costa brasileira desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul ocupando cerca de 12% do território nacional. Cinco séculos depois, a ocupação territorial da Floresta Atlântica restringiu-se a fragmentos florestais de variados tamanhos, restando apenas 7,3% de sua cobertura original (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 1998).

Espécies da Floresta Atlântica, como *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), sofreram erosão genética devido a destruição de seus habitats, seleção natural e agentes bióticos e abióticos. Uma das soluções para reverter essa situação está na criação de bancos de germoplasma. A propagação vegetal visando a conservação de germoplasma tem sido bastante empregada na perpetuação do acervo biológico de espécies vegetais a médio e longo prazo. Conseqüentemente, as coleções de germoplasma passaram a ter papel fundamental na conservação de espécies ameaçadas de extinção (TOWILL, 2000).

O germoplasma de uma espécie representa o conjunto de materiais hereditários e segundo Towill (2000), este conceito pode ser restrito ao conjunto de genótipos disponíveis para melhoramento de uma espécie cultivada.

A conservação de recursos genéticos pela implantação de bancos de germoplasma implica na manutenção de coleções *in situ* ou *ex situ*. No primeiro caso, as coleções de germoplasma são mantidas em campo, o que ocasiona altos custos de manutenção, além de o material ficar exposto a pragas e doenças. Já no segundo

caso, podem ser mantidos indivíduos, sementes, embriões ou outras estruturas vegetais sob diferentes condições no campo, em casas de vegetação, em câmaras frias, em meio de cultura com baixa concentração salina (conservação *in vitro*) ou criopreservadas, dependendo do material utilizado (PAIVA NETO, 1996).

Dentre os tipos de conservação *ex situ*, a conservação *in vitro* de germoplasma é aquela em que as coleções são introduzidas em laboratório utilizando-se diferentes estruturas da planta (explantes) e mantidas sob condições controladas e assépticas em frascos. Essas coleções podem ser estabelecidas a partir da germinação de sementes *in vitro*, cultura de ápices caulinares, gemas e meristemas (VIEIRA, 1999).

O resgate do germoplasma de uma espécie ameaçada pode ser feito por meio do uso das técnicas de propagação *in vitro*, proporcionando uma alternativa viável para reduzir as dificuldades encontradas na propagação natural do pau-brasil. Além de possibilitar a produção massal de plantas em um pequeno espaço físico e curto período de tempo, a propagação *in vitro* facilita o intercâmbio e preservação dessas espécies ameaçadas (CAMARGO, 1997).

Todavia, os protocolos convencionais de propagação *in vitro* para plantas lenhosas tropicais, como o pau-brasil, são dificultados por vários fatores como crescimento lento, elevados níveis de compostos fenólicos e taninos dos explantes o que inibe o processo de organogênese e provoca necrose do material inoculado (HARRY; THORPE, 1994).

Mesmo assim, as técnicas de propagação *in vitro* são métodos eficientes na conservação de recursos genéticos vegetais (HARDING; BENSON; CLACHER, 1997). Segundo Ferreira, Caldas e Pereira (1998), havendo dificuldades na conservação de sementes, a preservação do germoplasma *in vitro* pode ser aplicada com sucesso podendo originar outras plantas através do processo de organogênese direta ou indireta. Na organogênese direta, ápices caulinares são cultivados e geram outras plantas sem passar pelo estágio de calogênese. Na organogênese indireta, o material vegetal forma primeiramente um calo que se desenvolve por sucessivas divisões celulares culminando na formação de embriões somáticos (DODDS; ROBERTS, 1985, apud DONATO et al., 2000).

A partir do calo podem surgir células em diferentes estágios embriogênicos. Essas células podem dar origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas, processo esse denominado de embriogênese somática indireta. Dessa forma, a calogênese pode ser usada para regeneração de plantas em alta escala viável, principalmente, para aquelas que possuem longo período juvenil, elevado porte e baixa produção de sementes como ocorre com o pau-brasil. Suas sementes perdem a viabilidade em até três meses após a deiscência de seus frutos (BARBEDO; BILIA; FIGUEREDO-RIBEIRO, 2002).

A indução de calos é altamente desejável por ser um processo eficiente para produção de embriões somáticos individualizados e sementes sintéticas que adquirem competência para germinar e produzir outros indivíduos. Logo, a determinação de um protocolo de micropropagação depende do controle de inúmeras variáveis, que vão desde a assepsia do material coletado até a aclimatização do material produzido *in vitro*.

Na embriogênese somática indireta, esse processo passa pela indução da calogênese, que é influenciada pelo meio de cultura, balanço hormonal, concentração de fenóis e fontes de nitrogênio, entre outros. Essas variáveis precisam ser investigadas, minuciosamente, a fim de se estabelecer um protocolo que seja eficiente, prático e de custo reduzido para a criação de um banco de germoplasma visando a conservação do pau-brasil *ex situ* e *in vitro*.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Descrição da Espécie

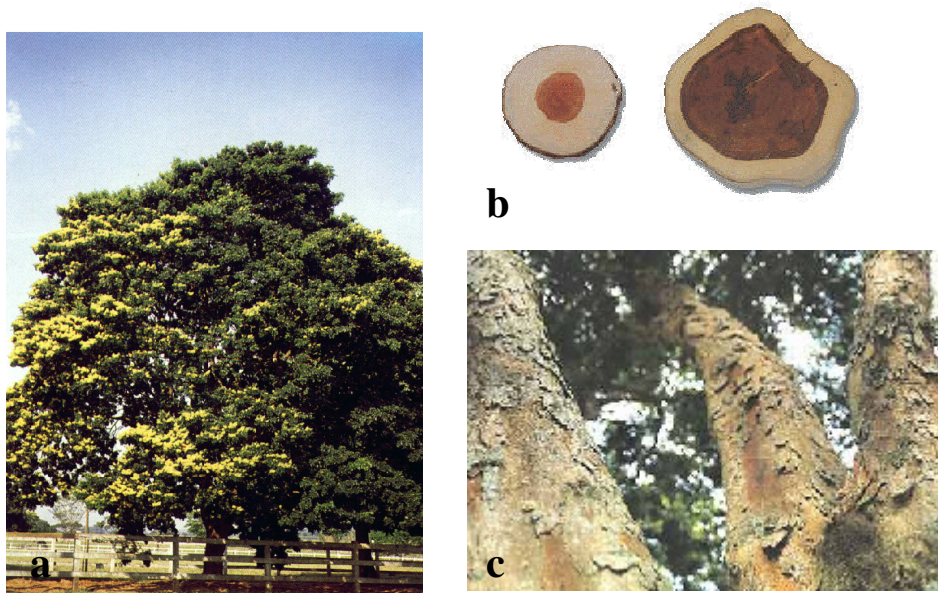
O gênero *Caesalpinia* foi descrito em 1753 por Carl Linnaeus [Lineu] (LIMA; LEWIS; BUENO, 2002). Em 1789, Jean Baptiste Lamarck (1744 a 1829) estudou e descreveu a espécie do pau-brasil cientificamente para que todos os cientistas a conhecessem por um único nome: *C. echinata*, sendo os termos *Caesalpinia* em homenagem ao botânico e médico, Andreas Caesalpinus que viveu entre 1519 a 1603, e *echinata* por ser uma árvore que possui acúleos nos galhos jovens e nos frutos (AURICCHIO, 1998).

A espécie foi assim classificada e denominada porque certas peculiaridades de sua morfologia floral, bem como determinadas características de suas folhas compostas bipenadas, apresentam traços comuns aos de outros 153 gêneros de árvores, arbustos e lianas agrupados sob a denominação *Caesalpinioideae* (LIMA; LEWIS; BUENO, 2002).

O pau-brasil pertence a família Fabaceae, e esta possui três grandes subgrupos, sendo esta espécie inserida no mais primitivo deles, o da subfamília Caesalpinioideae, porque apresenta maior número de características semelhantes com as espécies fósseis que deram origem à família (TUCKER, 2003). A subfamília Caesalpinioideae é atualmente dividida em cinco tribos: Cercideae, Caesalpinieae, Cassieae, Detarieae e Macrobioeae (BRUNEAU et al., 2001). Na tribo Caesalpinieae encontra-se o gênero *Caesalpinia* e dentro dele temos a espécie *C. echinata*, o pau-brasil.

C. echinata possui porte arbóreo podendo alcançar 30 metros de altura e 30 a 70 centímetros de diâmetro (Figura 1a). O lenho do pau-brasil é muito duro e pesado, com seu cerne de cor castanho-avermelhada, de onde eram extraídos os corantes (LIMA; LEWIS; BUENO, 2002), e seu alburno é amarelo claro, que constitui a parte mais jovem e externa do lenho (Figura 1b). Na base do tronco é comum haver reentrâncias ou pequenas expansões, comumente chamadas de sapopemas, é

comum também descamar (Figura 1c). A copa é bem irregular, com tendência a se tornar circular, repleta de galhos em sua maioria ascendentes e de tom cinza-claro nas partes mais velhas e verde-escuro nas terminações. (LIMA; LEWIS; BUENO, 2002). Segundo Lima, Lewis e Bueno (2002), é importante ressaltar que as variações na dureza e na coloração do cerne podem estar relacionadas com a idade ou o tipo de ambiente (mais seco ou mais úmido) no qual a árvore se desenvolve. O cerne é alaranjado, bastante evidente na árvore recém cortada, decorrente da presença de brasilina ($C_{16}H_{14}O_5$), que oxida com a exposição ao ar, assumindo coloração vermelho-coral (MAINIERI; CHIMELO; ANGYALOSSY, 1983).



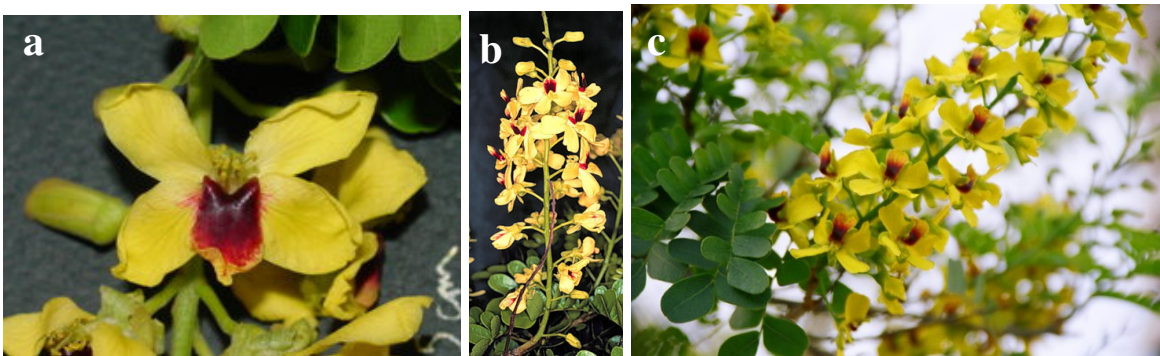
Figuras 1: Aspectos gerais de *C. echinata*. a. Aspecto geral da árvore; b. Cortes transversais de árvores de pau-brasil, uma com 12 anos (esquerda) e outra com 27 anos (direita); c. Aspecto do caule descamante. Fonte: Figura 1a: Lorenzi (1992); Figura 1b e 1c: Bueno (2002).

Seus ramos terminais (mais novos), cascas de espécimes mais jovens, folhas e frutos providos de pequenos acúleos (Figura 2a e 2b) (LORENZI, 1992).



Figura 2: Acúleos presentes em *C. echinata*. a. Aspecto do fruto com acúleos; b. Aspecto de ramos jovens com acúleos. Fonte: IPCI (2006).

O gênero *Caesalpinia* tem flores geralmente hermafroditas, com simetria radial ou bilateral (Figura 3a) e inflorescências indeterminadas (TUCKER, 2003). O pau-brasil possui inflorescências localizadas nos ramos terminais com flores amareladas muito perfumadas com aroma cítrico, levemente adocicado (LIMA; LEWIS; BUENO, 2002). As inflorescências têm aproximadamente 17 centímetros de comprimento, com aproximadamente 43 flores (Figura 3b e 3c). As flores são efêmeras permanecendo na planta por menos de uma semana e ficam abertas por menos de 24 horas (LIMA; LEWIS; BUENO, 2002). O cálice é de cor verde-amarelada que se abre em cinco lobos reflexos. As pétalas possuem intensa coloração amarela, com leves nuances avermelhadas na porção basal. A pétala mediana se diferencia das demais por uma mancha central vermelho-escura, que está associada a característica reprodutiva e talvez funcione como um sinalizador (ou guia) de néctar para os agentes polinizadores (LIMA; LEWIS; BUENO, 2002). As flores possuem 10 estames e um pistilo com o ovário súpero alongado.



Figuras 3: a. Aspecto da flor de *C. echinata*. b e c. Aspecto da inflorescência de *C. echinata*. Fonte: Figura 3a: Accardo Filho (2004); Figuras 3b e 3c: Árvores (2006).

Seus frutos são do tipo vagem (Figura 4), possuindo deiscência explosiva e são totalmente recobertos por acúleos que se formam logo após a floração. Os frutos contêm de 1 a 5 sementes irregularmente orbiculares, de coloração acastanhada (LIMA; LEWIS; BUENO, 2002). Após seu amadurecimento, deixam cair espontaneamente às sementes em menos de 50 dias (LORENZI, 1992). As sementes são arredondadas, chatas, castanhas (Figura 5) com cerca de 1,5 cm de diâmetro (CARVALHO, 2003).



Figura 4: Aspecto do fruto de *C. echinata*. Fonte: Lorenzi (1992).



Figura 5: Aspecto da semente de *C. echinata*. Fonte: Lorenzi (1992).

O pau-brasil possui folhas compostas (Figura 6), duplamente pinadas (bipinadas), com 5 a 6 pares de folíolos de 8 a 14 centímetros de comprimento e, em cada folíolo, 6 a 10 pares de foliólulos que possuem a base e o ápice oblíquos de 1 a 2 centímetros de comprimento (LORENZI, 1992). Suas folhas têm de 10 a 15 cm de comprimento.



Figura 6: Aspecto da folha de *C. echinata*.

De acordo com Lewis (1998), *C. echinata* não é classificada em táxons intra-específicos, embora muitas populações mostrem diferenças marcantes no tamanho e na forma dos foliólulos, na cor da madeira e no hábito. Três diferentes grupos de *C. echinata* estão sendo estudados por especialistas brasileiros e no futuro talvez a espécie possa ser separada em subespécies ou variedades.

Conforme Angyalossy, Amano e Alves (2005) o grupo mais comum, chamado popularmente de “arruda”, apresenta comparativamente os menores foliólulos (5-10 folíolos e 12-21 foliólulos de cerca de quatro centímetros) e cerne de coloração alaranjada, sendo encontrado em muitas localidades ao longo da costa brasileira (Figura 7). O segundo grupo difere pouco do primeiro, apresentando, contudo, foliólulos um pouco maiores (3-5 folíolos e 3-8 foliólulos de mais ou menos sete centímetros) e cerne com coloração laranja avermelhado, chamado popularmente de “café”. Deste último morfotipo são conhecidos apenas representantes cultivados nos Estados do Rio de Janeiro (Jardim Botânico) e Espírito Santo (Reserva Biológica de Sooretama). O terceiro grupo, chamado popularmente de “laranja”, apresenta foliólulos muito grandes (alguns dos quais com até 12 centímetros de comprimento) e cerne vermelho escuro, sendo encontrados naturalmente, até o momento, apenas em uma localidade na Bahia. Exemplares com as mesmas características estão sendo cultivados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

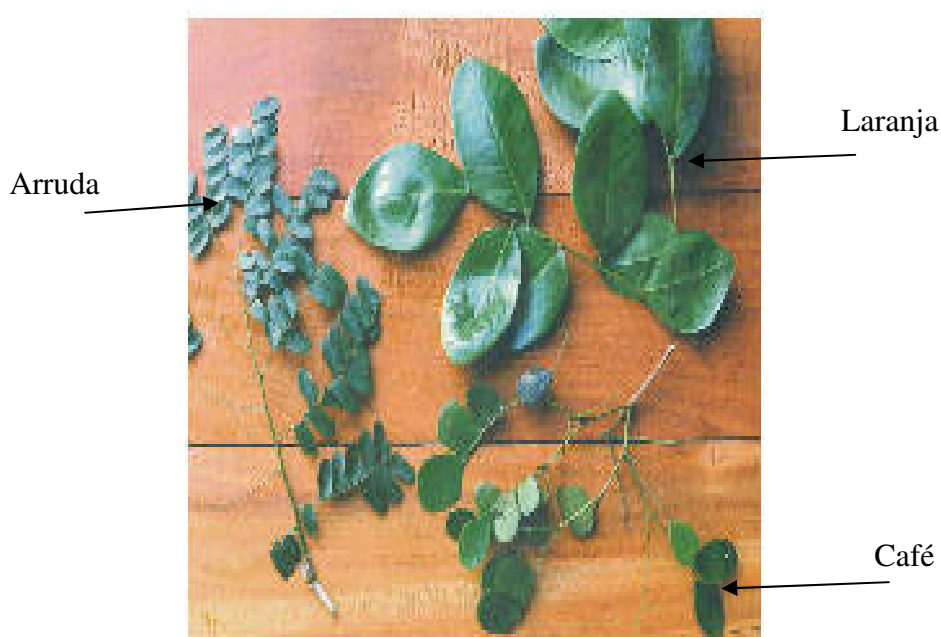


Figura 7: Aspecto das diferentes folhas das 3 variedades de *C. echinata*. Fonte: IPCI (2006).

Os nomes populares da espécie *C. echinata* são ibirapitanga, orabutã, arabutá, brasileiro, ibirapiranga, ibirapita, ibirapitã, muirapiranga, pau-rosado, pau-pernambuco, além de pau-brasil (LORENZI, 1992).

2.2- Aspectos Ecológicos

C. echinata é uma planta semidecídua e semi-heliófila da Floresta Estacional Caducifólia Costeira. É espécie clímax ocupando o estrato médio da floresta, podendo atingir cerca de 300 anos de idade (CARVALHO, 1994). Sua tolerância ao sol (heliófila), contudo, é derivada da observação de sua perfeita adaptação ao cultivo em áreas abertas e não de seu comportamento em locais de mata fechada (LORENZI, 1992).

Tanto a floração quanto a frutificação ocorrem em épocas diversas nas diferentes regiões. No sudeste, a espécie costuma florescer entre setembro e outubro, e frutificar entre outubro e dezembro. Já no Nordeste, o pico da floração ocorre entre outubro e novembro, e a frutificação ocorre entre novembro e janeiro. Em ambas as regiões os botões florais aparecem com o término da época de seca e após períodos de chuvas abundantes. O tipo de estratégia de floração é supra-anual, ou seja, a produção de flores numa mesma árvore costuma ser em intervalos superiores a um ano. Tal estratégia está relacionada ao alto custo energético desse fenômeno biológico em árvores que precisam se adaptar a ambientes tropicais (LIMA; LEWIS; BUENO, 2002).

No momento da abertura das valvas do fruto, as sementes são dispersas em 4 a 5 metros de distância da árvore-mãe. Segundo Carvalho (1994), a dispersão das sementes de *C. echinata* é autocórica. Começam a germinar de 4 a 5 dias mais tarde, quando se formam as plântulas com as primeiras folhas compostas de seis a dez folíolos (LIMA; LEWIS; BUENO, 2002).

Nas raras populações naturais remanescentes, as árvores florescem com mais de 10 anos de idade, enquanto exemplares cultivados normalmente florescem já com 5 a 6 anos (REZENDE et al., 2004).

2.3- Distribuição

Atualmente há evidências de que sua distribuição geográfica está restrita à costa ocidental atlântica brasileira, porém não se sabe ao certo sua freqüência ao longo desta área devido a drástica redução de suas populações (CORRÊA, 2003). Segundo Lima (1992), acredita-se que *C. echinata* era amplamente distribuída em todas as regiões da costa brasileira, pelo menos no trecho entre Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte. Nos últimos 10 anos foram constatadas ocorrências de populações remanescentes nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo. A sua área de ocorrência natural vai do Estado do Rio Grande do Norte ao Estado do Rio de Janeiro (Figura 8), em que ainda persistem alguns pequenos fragmentos de populações nativas (AGUIAR, 2001).



Figura 8: Áreas remanescentes de pau-brasil. Fonte: Bueno (2002).

Segundo Lima, Lewis e Bueno (2002), os dados sobre a distribuição geográfica do pau-brasil, continuam incompletos. Quanto ao panorama atual, não existem informações precisas sobre a distribuição da espécie nem estimativas do tamanho das populações ou da área total de florestas com pau-brasil.

2.4- Aspectos Econômicos

Sua madeira é muito dura, pesada, compacta, de grande resistência mecânica e praticamente incorruptível. Nos tempos coloniais era muito utilizada na construção civil e naval, e para trabalhos de torno, pela coloração vermelho-laranja-vivo (Figura 9). Era também exportada em grande quantidade para extração de um princípio colorante denominado "brasileína" muito usado para tingir tecidos e fabricar tintas de escrever, representando a primeira grande atividade econômica do Brasil. Sua madeira, já muito escassa, é empregada atualmente na confecção de arcos para instrumentos de corda sendo exportada para vários países (LORENZI, 1992).

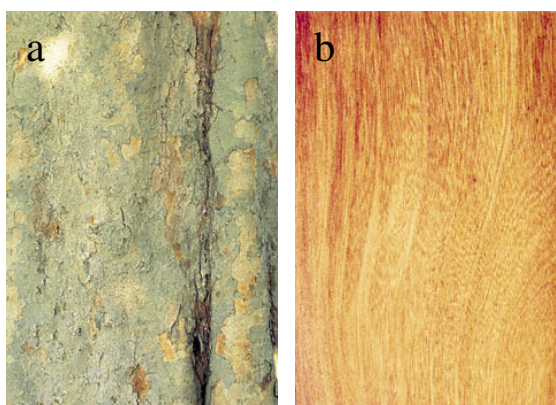


Figura 9: a. Aspecto do tronco de *C. echinata*. b. Madeira de *C. echinata* após ser lixada. Fonte: Lorenzi (1992).

A madeira do pau-brasil é reconhecida internacionalmente como a única que reúne características ideais para a confecção dos melhores arcos de instrumentos de corda, sendo marcante sua ressonância, densidade, durabilidade, beleza, além da extensão da curvatura, do peso, da espessura e de preciosas qualidades tonais (PIERCE 2002). Segundo Bueno (2002), ela vem sendo extraída ilegalmente e exportada sob a denominação de "pernambuco wood".

Sendo uma árvore de qualidades ornamentais notáveis e de grande importância histórica para o país (símbolo nacional), o pau-brasil é amplamente cultivado em todo o país com fins paisagísticos (LORENZI, 1992).

O ciclo econômico do pau-brasil no país teve início em 1502 e até 30 anos após a chegada dos portugueses, era o único recurso explorado pelos colonizadores. Nesse período calcula-se que foram exploradas 300 toneladas de madeira por ano, sempre aumentando nos anos posteriores. Com a exploração, a terra do pau-brasil tornou-se de muita importância, e em pouco tempo Pindorama (denominação tupi que significa Terra das Palmeiras), oscilou entre os nomes oficiais Ilha de Vera Cruz, Terra de Santa Cruz, Terra do Brasil e logo em seguida apenas por Brasil (AURICCHIO, 1998).

Devido a esta exploração predatória do pau-brasil, aliada à devastação das matas costeiras provocadas pela agricultura extensiva e pelo crescimento das áreas urbanas, atualmente, essa arbórea encontra-se na lista das espécies em perigo de extinção (BRASIL, 1992). Por esse motivo, estudos que levem ao seu conhecimento integral deverão apontar meios eficientes para a sua conservação e multiplicação.

2.5- Preservação

Em 1934, foi criado um anteprojeto do Código Florestal de 1931, pelo decreto nº 23.793 que foi transformado em lei, em defesa das florestas e matas particulares. O primeiro resultado concreto deste projeto foi a criação da primeira unidade de conservação no Brasil, o Parque Nacional de Itatiaia. Mesmo com a existência de um Código Florestal, este não garantia a total proteção da flora brasileira, incluindo o pau-brasil, que ainda tinha exemplares na faixa compreendida entre o Rio de Janeiro ao Rio Grande do Norte. Foi necessária a sua quase extinção para que o pau-brasil fosse reconhecido oficialmente na história brasileira. Em 1961, o presidente Jânio Quadros aprovou um projeto declarando o pau-brasil como árvore símbolo nacional (AURICCHIO, 1998).

Após realizado um substituto do projeto nº 1006, de 1972 por meio da lei nº 6.607 de 07/12/1978, sancionada pelo Presidente Ernesto Geisel, o pau-brasil foi declarado Árvore Nacional e 03 de maio instituído como o dia do pau-brasil (BRASIL, 1978).

2.6- Propagação *in vitro*

A biotecnologia compõe várias áreas, dentre elas está a cultura de tecidos vegetais, que é extremamente utilizada na propagação de plantas. Exemplo da versatilidade desta técnica é a regeneração de plantas via organogênese ou embriogênese somática (direta ou indireta) partindo de uma célula, tecido ou ainda por meio de cultura de protoplastos (SANTIAGO, 2003).

Cultura de tecidos ou micropropagação, ou ainda, cultura *in vitro* de plantas, é a metodologia de propagação vegetativa em que um explante (célula, tecido ou órgão) é cultivado em meio de cultura artificial, em ambiente asséptico e mantido em condições adequadas de luz e temperatura para promover a multiplicação somática de plantas e induzindo, assim, a sua diferenciação, para obter uma planta completa com todos os tecidos e órgãos que lhe são característicos e todas as suas funções orgânicas (FEVEREIRO; CAETANO; SANTOS, 2001).

Nos últimos 40 anos, as técnicas da cultura de tecidos *in vitro* passaram de uma curiosidade acadêmica para se constituírem num instrumento importante em todas as áreas da biologia aplicada. Sua importância é evidente na Biologia Vegetal por causa das oportunidades que se criaram para compreender, utilizar e conservar recursos genéticos de plantas. Portanto, é uma técnica importante na tentativa de estabelecer metodologias de propagação de várias espécies e por possibilitar resultados bastante práticos. No entanto, a cultura de tecidos ainda necessita de informações básicas para seu perfeito entendimento (PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O., 2001).

Vários métodos de cultura de tecidos, utilizando diversas partes das plantas, foram desenvolvidos com diferentes objetivos. Entre os principais métodos de cultura de tecidos estão a micropropagação, a cultura de meristemas, a microenxertia, a cultura de embriões, a cultura de calos, a suspensão celular, a polinização e fertilização *in*

in vitro, a cultura de ovários, a cultura de protoplastos e a embriogênese somática. Os principais usos da cultura de tecidos são produção de plantas *in vitro*, recuperação de plantas isentas de vírus (limpeza clonal), conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas (conservação de germoplasma), obtenção de mutantes *in vitro*, obtenção de organismos haplóides e haplodiplóides e a produção de plantas transgênicas (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998).

Para as espécies lenhosas os explantes mais utilizados para propagação vegetativa são ápices caulinares, micro-estacas, embriões, calos celulares, entre outras (PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O., 2001). A utilização desta técnica envolve a separação não convencional de parte do corpo do vegetal pela excisão de um explante. Uma nova planta representando a árvore matriz, ou nova geração, é produzida por organogênese ou por embriogênese somática. Estes processos de propagação vegetativa são adventícios, no sentido de que células ou tecidos não produzem embriões normalmente, mas podem ser induzidas a fazê-lo por desdiferenciação, indução e diferenciação (rediferenciação) de células em embriões, gemas ou calos (VENDRAME, 1994) (Figura 10).

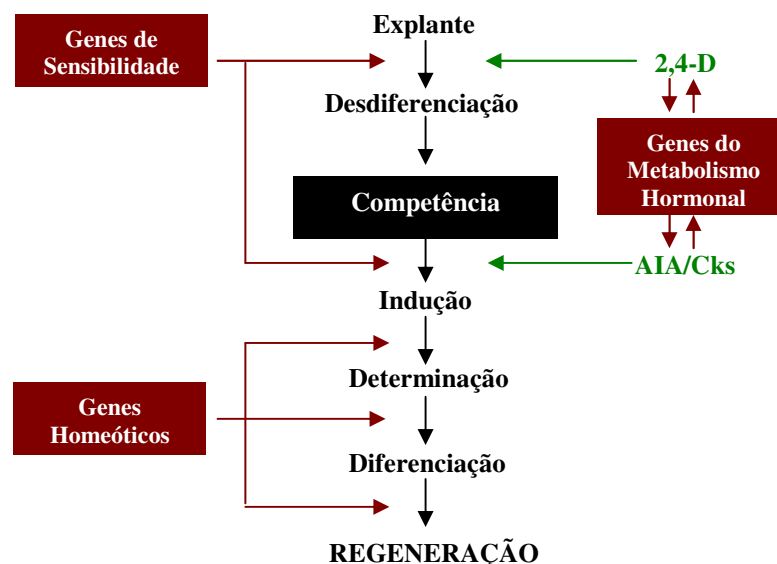


Figura 10: Esquema da competência organogenética. Os possíveis estágios onde atuariam diferentes genes que influenciam a regeneração são indicados em vermelho. Os genes de sensibilidade, seriam aqueles envolvidos na percepção (codificação de receptores) e transdução do sinal para auxinas (AIA, 2,4D) e citocininas (Cks). Os genes de metabolismo hormonal (que codificam enzimas de biossíntese e/ou degradação de hormônios) são os responsáveis pelo estabelecimento de um balanço hormonal endógeno necessário para a regeneração. Genes homeóticos controlam a formação de órgãos e, portanto, podem estar associados à regeneração de novas gemas caulinares ou raízes. A expressão desfavorável de qualquer uma dessas classes de genes seria suficiente para impedir a regeneração de um determinado explante. Fonte: Christianson e Warnick (1988).

Essa capacidade dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* para formar gemas, raízes ou embriões somáticos tem despertado a atenção de pesquisadores, devido a sua grande implicação prática e importância para o avanço dos conhecimentos nas áreas de fisiologia, bioquímica e genética de plantas. Isso só foi possível depois de reconhecida a totipotência das células vegetais, em que as células são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados. A totipotencialidade, todavia, não tem sido facilmente demonstrada, conhecendo-se muitas espécies cuja capacidade regenerativa não foi ainda evidenciada na prática. Mesmo aceitando-se em princípio esta afirmação, é bem conhecido o fato de certos tecidos serem mais favoráveis à regeneração de gemas, raízes e embriões somáticos do que outros (KERBAUY, 1998).

Portanto, o cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, como o pau-brasil, enfrenta algumas dificuldades naturais devido a limitada expressão da totipotencialidade celular. Compartilhando da mesma ideia, Jones (1991) percebeu que a utilização da técnica de cultura de tecidos em espécies lenhosas tem pouco sucesso inicialmente, restringindo-se aos estudos com sementes e explantes de mudas, sendo que atualmente, estas técnicas têm sido utilizadas com êxito em explantes oriundos de plantas adultas. Estudos com lenhosas *in vitro* em zonas temperadas têm mostrado que a capacidade para organogênese de explantes segue uma tendência segundo a qual as estações do ano para a obtenção dos explantes influenciam em respostas diferentes durante a cultura *in vitro* (LARDET et al., 1998).

Como a propagação do pau-brasil por meio de sementes é limitada devido à baixa e irregular produção, a cultura de tecidos torna-se uma importante ferramenta para a determinação de vias alternativas de propagação da espécie, sendo uma dessas vias a embriogênese somática.

O termo “somático” refere-se ao fato de o embrião desenvolver-se assexuadamente de tecido vegetativo (somático), onde células somáticas diplóides desenvolvem-se em plantas diferenciadas sem a fusão de gametas (VENDRAME, 1994). A embriogênese somática pode se dar de forma direta ou indireta, sendo que na maioria dos sistemas ela ocorre de forma indireta. Na via direta, os embriões surgem de calos apenas cicatriciais, sem passarem pela fase de calo indiferenciado,

originando-se, aparentemente, de células embriogênicas pré-determinadas (SÖNDAHL; NAKAMURA; SHARP, 1985), que são moduladas, aparentemente, por meios ricos em citocininas e desprovidos de auxinas (DUBLIN, 1981). A embriogênese somática indireta, requer a redeterminação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Os embriões surgem de calos primários não diferenciados ou de calos secundários, que são fortemente embriogênicos (DUBLIN, 1984).

Barros (1999) ressalta que dentre os processos de micropropagação, a embriogênese somática é, teoricamente, a melhor opção para a propagação *in vitro* de frutíferas por apresentar algumas vantagens, tais como: alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação; produção em larga escala pela manutenção da cultura em meio líquido; plantio direto da muda obtida via embriogênese somática sem necessidade de enxertia, com menor custo de produção, além de a planta ser geneticamente semelhante à planta mãe, sem as influências do porta-enxerto, como acontece com as plantas obtidas por métodos de propagação vegetativa convencionais.

Porém, a embriogênese somática também apresenta algumas limitações que têm dificultado sua utilização como sistema de micropropagação. A primeira e maior delas diz respeito à necessidade da obtenção de um sistema de embriogênese reproduzível em larga escala. Outra limitação é quanto à variabilidade genética indesejável, às vezes, introduzida pelo processo. Essas anormalidades genéticas, especialmente na forma de poliploidia e aneuploidia, são descritas em geral como resultado da passagem pela fase de calo, quando as células estariam mais sujeitas a sofrerem alterações (AMMIRATO, 1983; KRIKORIAN; O'CONNOR; FITTER, 1983).

2.7- Embriogênese Somática Indireta

No modelo indireto da embriogênese somática, ocorre a diferenciação de calo e o surgimento de regiões friáveis, normalmente brancos e translúcidos, convencionalmente designados de massas ou complexos celulares pró-

embriogênicos (PEMs), os quais se dividem para formar pró-embriões somáticos (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998), e destes surgem os embriões somáticos de fato, que tem possibilidade de regenerar uma planta normal. Este tipo de propagação é considerado como um método potencial, caso as variações genéticas (mutações) não atinjam valores percentuais elevados (PIERIK, 1985).

No método indireto o explante passa necessariamente pela fase de calo, que são tecidos não diferenciados, constituídos por massa de células diferenciadas e desorganizadas que se desenvolvem como resposta a injúrias físicas ou desbalanço hormonal (YEOMAN; MACLEOD, 1977) e podem apresentar composição bioquímica e exigências distintas em relação ao explante de origem (PHAN; DO; HEGEDUS, 1987). Esta cultura de calos pode ser iniciada *in vitro* colocando uma pequena parte de uma planta (explante) no meio de cultura, em condições assépticas. Sob o estímulo de substâncias de crescimento endógenas ou de reguladores de crescimento adicionados ao meio, o metabolismo celular, que se encontra no estágio quiescente, é modificado iniciando-se uma divisão ativa. Durante o processo, a diferenciação e a especialização celular são revertidas e o explante origina um novo tecido que é composto de células meristemáticas e não especializadas (PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O., 2001).

Segundo Wann (1989), o princípio básico para o controle da calogênese *in vitro* tem sido realizado por meio da manipulação do ambiente físico, nutricional e hormonal. A esse respeito, ressaltam as condições do ambiente em que a planta se desenvolve, o genótipo, a idade dos explantes, os componentes do meio de cultura e o balanço hormonal, como os fatores que mais influenciam a indução e o controle de calos embriogênicos *in vitro* (SPIEGEL-ROY; VARDI, 1984).

Algumas fontes de explantes já foram testadas para indução de calos, como segmento do hipocótilo, discos foliares, raiz, contilédones e outras partes (GEETHA et al., 1998). Nos calos, as células têm pequeno grau de diferenciação e são desorganizadas podendo apresentar algumas áreas com tecido organizado (PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O., 2001) (Figura 11).

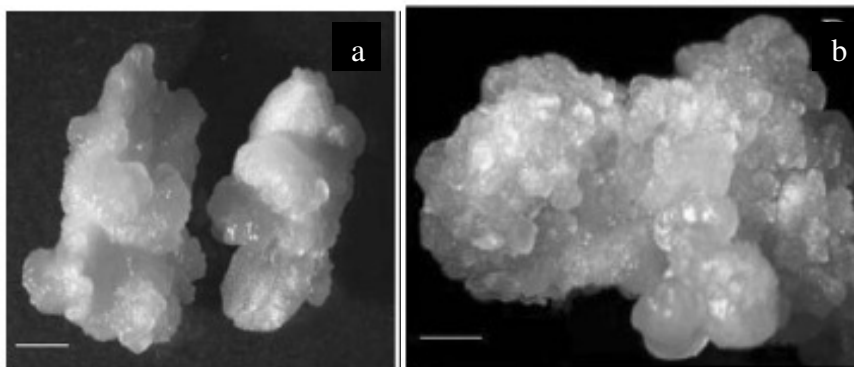


Figura 11: Calos de *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis*. a e b. Aspecto de calos após 3 semanas no meio de cultura. Bar: 1,5 mm. Fonte: Chen e outros (2005).

Durante o processo de diferenciação (rediferenciação) das células presente nos calos, novos meristemas são formados no tecido e esses originam células parenquimatosas não diferenciadas, sem nenhuma estrutura organizada, característica do órgão ou tecido do qual foram derivadas. Embora o calo permaneça não organizado, o crescimento continua e, alguns tipos de células especializadas podem ser formadas. Tal diferenciação pode ocorrer em locais aleatórios ou associados a centros de morfogênese que originam órgãos como raízes, brotações e embriões. A produção de novas plantas de cultura não organizadas é frequentemente referida como regeneração (PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O., 2001).

Tecidos vegetais usualmente requerem fontes dos fitormônios, sobretudo auxinas e citocininas, para a proliferação contínua de uma cultura sobre um meio completo. Uma auxina e/ou citocinina são normalmente requeridos para a dediferenciação dos tecidos vegetais *in vitro*, para o crescimento contínuo dos calos e para a formação dos embriões somáticos (SANTANA; PAIVA, 2001).

Contudo, a dediferenciação e indução da regeneração de plantas a partir de calos são, muitas vezes, processos difíceis de serem obtidos e podem demandar algum tempo de experimentação até obtenção de protocolos para multiplicação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Os tipos de calos utilizados variam de acordo com o objetivo do trabalho. Calos “firmes” por serem altamente lignificados e de textura dura, são indicados para organogênese. Por outro lado, calos “friáveis” (mole), que são frágeis e separam-se

facilmente, constituem o tipo mais utilizado em suspensão celular (PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O., 2001). Normalmente, os calos “friáveis” são brancos e translúcidos, convencionalmente designado de massas ou complexo celulares pró-embriogênicos (PEMs), os quais se dividem para formar pró-embriões somáticos (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999) (Figura 12). A coloração dos calos também é variável podendo ser amarelo, verde, branco, dentre outras.

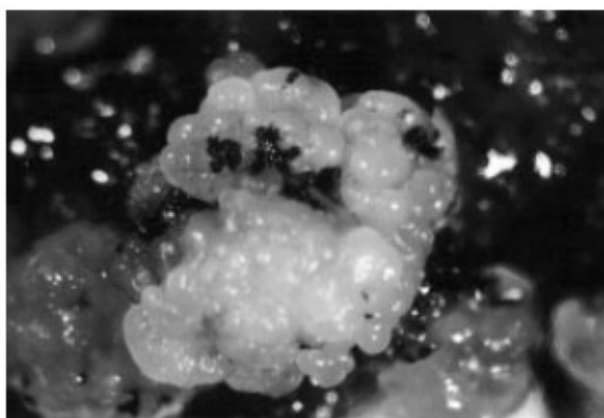


Figura 12: Complexos celulares pró-embriogênicos (PEMs) formados a partir de embriões zigóticos de *Diospyros kaki* (Caquizeiro), em meio MS1/2NO₃, com 10 µM de 2,4-D e 2 µM de cinetina, aos 150 dias de cultivo. Fonte: Carvalho e outros (2004).

Na manutenção dos calos, o mais comum é usar o mesmo meio de cultura básico da indução. Algumas características básicas do calo com sinal de “velhice” é a desaceleração do crescimento (pode ser avaliada pesando os calos de três em três dias, construindo uma curva de crescimento), necrose do tecido, escurecimento do tecido, secamento, o que pode ser devido a exaustão de nutrientes e a inibição do crescimento (PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O., 2001).

A cultura de calos tem várias aplicações, como permitir o estudo do desenvolvimento celular, exploração de produtos secundários (metabólitos de plantas medicinais), obtenção de suspensões celulares (evitando o extrativismo da planta), propagação da espécie onde a via direta é difícil, sendo neste caso, recomendada a sua utilização mesmo existindo risco de variação somaclonal. A cultura de calos permite também estudar a citodiferenciação e a morfogênese, além da indução de mutação através de técnicas químicas ou radiação (PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O., 2001).

A propagação de plantas lenhosas a partir de tecidos como calos tem sido observada em várias espécies, como moreira (PAIVA NETO, 1996), *Hypericum brasiliense* (CARDOSO; OLIVEIRA, 1996) e castanha-do-brasil (CAMARGO, 1997; SERRA, 1999), dentre outras. Contudo, essas espécies demonstram dificuldade de propagação.

2.8- Fonte de Explante

A fonte de explante deve ser cuidadosamente selecionada, uma vez que o tipo de explante utilizado muitas vezes determina o grau de sucesso na micropropagação. Explantes juvenis provenientes de sementes e partes juvenis de plantas adultas são os preferidos, embora tecidos adultos de folhas e flores sejam igualmente utilizados. Os explantes devem ser retirados de plantas em crescimento ativo e que não estejam passando por qualquer tipo de estresse, como seca, temperaturas excessivamente baixas ou altas, deficiência mineral e ataque de pragas ou doenças (TEIXEIRA, 2006).

A seleção dos explantes e as condições de cultura representam um fator importante, uma vez que vários tecidos da mesma planta ou tecidos em diferentes estágios de desenvolvimento podem diferir em sua resposta, quando cultivados *in vitro* (ROBERTS et al., 1993).

Ao se utilizar explantes de folhas, partes reprodutivas ou outros tecidos num estágio avançado de diferenciação, há, em geral, a necessidade de se induzir uma volta ao estado meristemático para, em seguida, iniciar o processo de multiplicação. A desdiferenciação e indução de regeneração de plantas a partir de calos é, muitas vezes, um processo difícil de ser obtido e pode demandar algum tempo de experimentação, até se obterem protocolos para a multiplicação, além de ocasionar o aparecimento de mutantes indesejados, como variantes somaclonais (LEE; PHILLIPS, 1988).

2.9- Meios de Cultura

O meio de cultura deve suprir os tecidos e os órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao crescimento (PASQUAL,2001). Os estudos de nutrição vegetal, provenientes da fisiologia vegetal informam que os elementos que compõem o meio nutritivo da cultura *in vitro* devem pertencer à categoria dos essenciais, isto é, a planta não se desenvolve na sua ausência. Existem dois grupos: os macronutrientes (nitrogênio, potássio, cálcio, fósforo, magnésio, enxofre e silício) e os micronutrientes (cloro, ferro, boro, manganês, sódio, zinco, cobre, níquel e molibidênio) (TAIZ; ZEIGER, 2003). Essas substâncias essenciais controlam o crescimento dos tecidos e, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

As mesmas vias metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas *in vitro*, embora alguns processos, como fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro*. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Com base nisso, os meios de cultura são então preparados a partir de alguns ou todos os seguintes componentes: água, macronutrientes (Ca, Mg, K, N, P, S), micronutrientes (Mn, Zn, B, Cu, Mo, Co, I, Si, Al, Ni, Fé, Cl, Na), vitaminas, aminoácidos, suplementos indefinidos (extrato de malte e de leveduras, sucos, polpas e extratos de vários frutos – banana, tomate, leite, água de coco, extrato de plântulas, raízes, embriões zigóticos imaturos ou folhas, extrato de batata e milho, etc.), ácidos orgânicos (ácido málico, ácido cítrico, ácido fumárico, piruvato de sódio), reguladores de crescimento, açúcares, agentes geleificantes, antibióticos e fungicidas, antioxidantes e carvão ativado (PIERIK, 1987).

Apesar de tantos ingredientes, convém registrar que para cada situação (tipo de explante, espécie, cultivar, objetivo) o meio mais adequado e eficiente é variável. Então, para determinar o melhor meio para cada caso, deve-se lançar mão de diversos ensaios. Desta forma, os resultados serão melhores e a técnica de cultura de tecidos poderá ser utilizada conforme os objetivos propostos.

Inicialmente, foram utilizados os mais diferentes tipos de meios e componentes. Segundo George (2008), os meios mais utilizados no cultivo *in vitro* são o MS, desenvolvido por Murashigue e Skoog (1962), o WPM (woody plant médium), formulado por Lloyd e Mc Cown (1981), o B5, estabelecido por Gamborg, Miller e Ojima (1968) e o de White (WHITE, 1943).

O meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), inicialmente formulado para o tabaco, possui alta concentração de amônio e nitrato, além do nitrogênio, o potássio encontra-se também em concentrações altas. A alta concentração de sais encontrada neste meio tem proporcionado ganhos significativos no crescimento de diversas espécies *in vitro*, sendo hoje o meio mais utilizado na cultura de tecidos vegetais. Uma das críticas feitas a este meio refere-se ao baixo nível de fosfato que, para alguns pesquisadores, é insuficiente para sustentar o crescimento das culturas (PASQUAL, 2001).

O meio WPM (LLOYD; MC COWN, 1981), foi desenvolvido para cultura de brotações em plantas lenhosas. É amplamente utilizado na micropropagação de arbustos e árvores (PASQUAL, 2001).

O meio B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA 1968) é usado para calos e culturas em suspensão, e ocasionalmente para cultura de anteras em plantas de várias famílias. Sendo que, apenas raramente é reportado o seu uso como um meio para embriogenese ou calogênese (GEORGE, 2008).

O meio White (WHITE, 1943) foi originalmente usado para cultura de raiz e calos, atualmente é mais empregado para enraizamento de microestacas de algumas espécies (GEORGE, 2008).

Com relação a lenhosas, segundo Harry e Thorpe (1994), existe uma variedade de meios e concentrações salinas sendo testados, porém o meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) continua sendo o mais empregado para estas espécies. Contudo, algumas pesquisas têm usado modificações deste meio ou até outros meios como o WPM (LLOYD; MC COWN, 1981) e o B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA 1968).

É essencial para a micropropagação que o meio nutritivo elaborado forneça condições ideais para que haja um bom crescimento vegetativo, além de um índice de multiplicação adequado, com a finalidade de formação de embriões somáticos. Logo, se faz necessários testes com as diferentes formulações descritas acima.

2.10- Fontes de Nitrogênio no Cultivo *in vitro*

O nitrogênio (N) é um nutriente de essencialidade incontestável dentro de qualquer fase do desenvolvimento vegetal e uma de suas funções é a formação de compostos básicos ao ciclo de vida vegetal (aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos, entre outros) (CAPALDI, 2002). Tanto o crescimento quanto a morfogênese e a totipotência celular em culturas *in vivo* e *in vitro* são sensivelmente influenciados pela disponibilidade de “N” e pela forma em que é apresentado (PASQUAL, 2001).

Nas culturas *in vitro*, praticamente todos os meios de cultura fornecem “N” disponível na forma de íons nitrato (NO_3^-), porém, dentro da célula, o nitrato tem que ser reduzido para amônio (NH_4^+) antes de ser biossinteticamente utilizado. No entanto, o NH_4^+ , quando fornecido sozinho ao meio, causa problemas de toxidez. Por isso, ele é usado de forma combinada com o NO_3^- (PASQUAL, 2001).

Além das formas inorgânicas de nitrogênio, podem ser fornecidas as formas orgânicas, as quais são prontamente assimiláveis pelas células vegetais. As formas específicas de nitrogênio orgânico incluem uréia, aminoácidos, poliaminas e ureídeos (GROTHGE, 1992).

Dentre os aminoácidos fornecidos como fonte de nitrogênio, temos a glutamina (precursora dos demais aminoácidos), que também tem sido utilizada com muito

sucesso na complementação das fontes inorgânicas de nitrogênio, ou ainda como fonte única de nitrogênio, promovendo o crescimento de tecidos *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Sabendo-se que o nitrogênio é um dos responsáveis pelas características desejáveis na cultura *in vitro*, é importante realizar experimentos, utilizando diferentes fontes de nitrogênio, a fim de avaliar os seus efeitos sobre o desenvolvimento de calos e sua eficiência na multiplicação *in vitro*.

2.11- Reguladores de crescimento

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. São cinco as classes de reguladores de crescimento: auxinas, citocininas, giberelinas, inibidores e etileno (TAIZ; ZEIGER, 2003).

As auxinas mais utilizadas são o ácido indol-butírico (AIA), o ácido naftaleno-acético (ANA) e o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). As duas primeiras são, geralmente, utilizadas na fase de enraizamento e a última na indução de calos e embriogênese somática (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Das citocininas comercialmente disponíveis, o 6-benzilaminopurina (BAP) é o regulador de crescimento que, em geral, apresenta melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação de diversas espécies, sendo utilizado em aproximadamente 60% dos meios, seguido de cinetina (KIN) com cerca de 23%.

Em vários tecidos cultivados *in vitro*, a utilização de substâncias reguladoras do crescimento tem-se mostrado de importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação, condições estas necessárias à formação de meristemas caulinares e/ ou radiculares. A desdiferenciação inicial dos explantes resulta na formação de calos com células ou grupos de células competentes, ou seja, com capacidade de responder aos efeitos estimulatórios do meio de cultura para a formação de gemas (KERBAUY, 1998).

Em geral, na maioria dos modelos de embriogênese induzida *in vitro*, as auxinas e entre elas o 2,4-D, são consideradas as substâncias responsáveis por desencadear os processos de desdiferenciação (modelos indiretos - calos) e rediferenciação (modelos diretos), alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Tem sido sugerido que a auxina é necessária para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais, expressando a totipotência das células competentes (KOMAMINE, et al., 1992). Em muitas espécies, o processo de iniciação da calogênese se verifica ao se cultivar o explante em meio com concentração relativamente elevada de 2,4-D (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

A eficiência dos explantes em gerar calos varia de espécie para espécie. Algumas são induzidas apenas com 2,4-D, outras necessitam de uma combinação de diferentes hormônios como AIA e BAP, ANA e BAP, ANA e cinetina, AIA e cinetina (NEWMAN; KRISHNARAJ; SAXENA, 1996).

Tem sido sugerido que a manutenção prolongada das culturas embriogênicas em meio com 2,4-D causa variações genéticas e epigenéticas que afetam o potencial embriogênico (CALIGARI; SHOHET, 1993). Observou-se em alguns sistemas que os embriões somáticos tornam-se habituados durante períodos prolongados de subcultivos em 2,4-D, resultando na perda do potencial de maturação (TAUTORUS; FOWKE; DUNSTAN, 1991).

As citocininas podem favorecer a produção de calo embriogênico (CHÉE; CANTLIFFE, 1988). De acordo com Schenk e Hilderbrandt (1972) baixas concentrações de citocininas foram necessárias para a embriogênese somática na maioria das culturas de células de dicotiledôneas.

Segundo Jiménez (2001), numa lista de 65 espécies de dicotiledôneas revisadas por Raemakers, Jacobsen e Visser (1995), a embriogênese somática foi induzida em 17

espécies em meio de cultura sem hormônio, 29 espécies em meio de cultura contendo auxina e 25 espécies em meio de cultura suplementado com citocinina. Entre as auxinas, aquela utilizada com maior frequência foi o 2,4-D (49%) seguido pelo ácido naftaleno acético (27%), indol-3- ácido acético (6%), indol-3- ácido butírico (6%), Picloram (5%) e Dicamba (5%). No caso das citocininas, o 6-benzilaminopurina (6-BAP) foi o mais utilizado, seguido pela cinetina (37%), zeatina (3%) e thidiazuron (3%).

Portanto, o uso das peculiaridades dos reguladores de crescimento, como os diferentes balanços entre eles, podem controlar o crescimento e o desenvolvimento *in vitro*, assim testes neste sentido podem direcionar o metabolismo do explante para um caminho desejado.

3- OBJETIVO GERAL

Implantar um banco de germoplasma para conservação do pau-brasil *ex situ* utilizando as técnicas de propagação *in vitro*.

3.1- Objetivos Específicos

- Demonstrar a relação entre a idade fisiológica de foliólulos de pau-brasil na indução da calogênese e no controle da oxidação;
- Avaliar o efeito dos meios de cultura MS, B5, WPM e White no desenvolvimento de calos e na indução da embriogênese somática;
- Estimular o crescimento de calos e avaliar possíveis efeitos na expressão de embriões somáticos testando diferentes fontes nitrogenadas;
- Verificar a influência da interação entre os reguladores de crescimento auxinas (2,4-D, AIA, AIB) e citocininas (BAP, KIN) na resposta morfogênética em calos de pau-brasil.

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCARDO FILHO, M. A. P. **Imagem:Caesalpinia echinata-flor**. 2004. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:Caesalpinia_echinata-flor.jpg>. Acesso em: 18 mai. 2006.

ÁRVORES FLORIDAS – **Pau Brasil**. Disponível em: <http://www.fotografia-na.net/data/media/10/Brasil__As_Arvores_Floridas_Pau_Brasil_Petrolina_PE_600_400_jpeg_50230024.jpg>. Acesso em: 19 jun. 2006.

AGUIAR, F. F. A. Fenologia do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) em Moji-Guaçu, SP. **Ecossistema**. v. 26, p. 107-112, 2001.

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y., (ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillian, 1983. p. 82-123.

ANGYALOSSY, V.; AMANO, E.; ALVES, E. S. Madeiras utilizadas na fabricação de arcos para instrumentos de corda: aspectos anatômicos. **Acta Botanica Brasílica**. v. 19, p. 819-834, 2005.

AURICCHIO A. L. R. Pau brasil. **Instituto Pau Brasil História Natural**. São Paulo, 1998. Disponível em:<<http://www.institutopaubrasil.org.br/paubrasil.cfm>>. Acesso em: 20 fev. 2006.

BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.4, p.431-439, 2002.

BARROS, L. M. Embriogênese somática. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 7, p. 36-39, 1999.

BRASIL. Lei nº 6.607, de 07 de dezembro de 1978. Dispõe sobre o pau-brasil como a Árvore Nacional, e institui o dia 03 de maio como o dia do pau-brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 12 dez. 1978. Disponível em: <http://legislacao.planalto.gov.br/legislacao.nsf/fraWeb?OpenFrameSet&Frame=frmWeb2&Src=%2Flegislacao.nsf%2FViw_Identificacao%2Flei%25206.607-1978%3FOpenDocument%26AutoFramed>. Acesso em: 11 mar. 2006.

BRASIL. Portaria nº 006-N, de 15 de Janeiro de 1992. Dispõe sobre a Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 jan. 1992. Seção 1, v. 130, n. 16.

BRUNEAU, A.; FOREST, F.; HERENDEEN, P. S.; KLITGAARD, B. B.; LEWIS, G. P. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. **Systematic Botanic**. n. 26, p. 487-514, 2001.

BUENO, E. **Pau-brasil**. São Paulo: Axis Mundi, 2002.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v. 1, p. 87-132.

CALIGARI, P. D. S.; SHOHET, S. Variability in somatic embryos. In: REDENBAUGH, K., ed. **Synseeds**: Applications of synthetic seeds to crop improvement. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993.

CAMARGO, I. P. de. **Estudo sobre a propagação da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.)**. Lavras: UFLA, 124 p. 1997. Tese (Doutorado – Fitotecnia)

CAPALDI, F. R. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Cryptomeria japonica* D. DON. “ELEGANS” cultivados *in vitro*: Análises bioquímicas e relações entre reguladores vegetais**. Piracicaba: ESALQ/USP, 65 p. 2002. Dissertação (mestrado).

CARDOSO, M. A.; OLIVEIRA, D. E. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: shoot multiplication and callus induction. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Hague, v. 44, p. 91-94, 1996.

CARVALHO, L.D. **PROGRAMA PAU-BRASIL**. Bahia, 2003. Disponível em: <<http://www.cepec.gov.br>>. Acesso em: 15 mai. 2006.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras – recomendações Silviculturais, Potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ/SPI, 1994. p.113-117.

CARVALHO, D. C. de; BIASI, L. A.; RIBAS, L. L. F.; TELLES, C. A.; ZANETTE, F. Embriogênese Somática do Caquiizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal – SP, v. 26, n. 2, p. 280-283, 2004.

CHÉE, R. P., CANTLIFFE, D. J. Selective enhancement of *Ipomoea batatas* Poir. embryogenic and non-embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 15, p. 149-159, 1988.

CHEN, L.; ZHU, X. Y.; GU, L.; WU, J. Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem). **Plant Cell Report**, v. 24, p. 401-407, 2005.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis in vitro as a developmental process. **HortScience**, 23:515-519, 1988.

CORRÊA, M. A. Morfologia Polínica de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p. 35-359, 2003.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University, 1985. 216p. In: DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; CABRAL, J.B.; ALVES, G.D. Embriogênese somática *in vitro* em Couve-

Comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p.711-718, abr. 2000.

DUBLIN, P. **Café Cacao Thé**. n. 25, p. 237-242, 1981.

DUBLIN, P. **Café Cacao Thé**. n. 28, p. 231-244, 1984.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da Cultura de Tecidos no Melhoramento Genético de Plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v. 1, p. 24.

FEVEREIRO, M. P.; CAETANO, H. V.; SANTOS, M. G. **Cadernos didáticos de Ciências**. Lisboa: Ministério da Educação, v. 1. 2001.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período de 1990-1995**. São Paulo. 1998.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell. Res.** n. 50, p. 151-158, 1968.

GEETHA, N.; VENKATACHALAM, P.; REDDY, P. S.; RAJASEGER, G. *In vitro* plant regeneration from leaf callus cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Advances in Plant Scienci**, n. 11, p. 253-257, 1998.

GEORGE, E. F. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In: _____. **Plant Propagation by Tissue Culture: The Technology**. New York: Springer, 2008. cap. 3, p. 65-113.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (ed.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 99-169.

GROTHGE, M. T. **Efeito de várias fontes de nitrogênio na multiplicação in vitro de clones de *Eucalyptus grandis* HILL ex MAIDEN**. 1992. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1992.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1999. v. 2, p. 537-548.

HARDING, K.; BENSON, E. E.; CLACHER, K. Plant conservation biotechnology: An overview. **Agro-Food-Industry Hi-Tech**, may-june, 1997.

HARRY, I. S.; THORPE, T. A. *In vitro* Culture of Forest Trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (ed.) **Plant Cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 539-560.

IPCI COMURNAT, **What is pernambuco?** Disponível em: <<http://www.ipci-comurnat.org/eng02.htm>>. Acesso em: 29 de abr. 2006.

JIMENEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Rev. Bras. Fisiol. Veg**, v. 13, n. 2, p.196-223. 2001.

JONES, O. P. The role of biotechnology in the multiplication and improvement of wood plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 239, p. 35-44, 1991.

KERBAUY, G. B. Competência e Determinação Celular em Cultura de Células e Tecidos de Plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v. 2, p. 519-528.

KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIMURA, A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell culture. Physiology, biochemistry and molecular biology. **In vitro Cell. And Dev. Biol.**, v. 28, p. 11-14, 1992.

KRIKORIAN, A. D.; O'CONNOR, S. A.; FITTER, M. S.; Chromosome number variation and karyotype stability in cultures and cultures derived plants. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y., (ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. p. 541-581.

LARDET, L.; AGUILAR, M. E.; MICHAUX-FERRIERE, N.; BERTHOULY, M. Effect of strictly plant-related factors on the response of *Hevea brasiliensis* and *Theobroma cacao* nodal explants culture *in vitro*. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, v. 34, n.1, p. 34-40, 1998.

LEE, M.; PHILLIPS, R. L. The chromosomal basis of somaclonal variation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 413-437, 1988.

LEWIS, G. P. *Caesalpinia. A Revision of the Poincianella-Erythrostemon group*. Kew, **Royal Botanic Gardens**. 1998.

LIMA, H. C.; LEWIS, G. P.; BUENO, E. Pau-brasil: uma biografia. In: BUENO, E. (ed.) **Eduardo Bueno PAU-BRASIL**. São Paulo: Axis Mundi, 2002. p. 48-50.

LIMA, H. C. Aspectos Botânicos do pau-brasil. In: CUNHA, M. V.; LIMA, H. C. (ed.). **Viagem à terra do pau-brasil**. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura. 1992. p. 23-38.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially-feasible micropropagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1981.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Nova Odessa, São Paulo: Plantarum, 1992. v. 1. p. 352.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J. P.; ANGYALOSSY, V. **Manual de identificação das principais madeiras comerciais brasileiras**. São Paulo: Promocet. 1983.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PAIVA NETO, V. B. de. **Comportamento “in vitro” de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)**. Lavras: UFLA, 1996. 39 p. Dissertação (Mestrado).

NEWMAN, P. O.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P. K. Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*), somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl segments induced with Benzylaminopurine. **Intr. J. Plant Sci.** n. 157, p. 554-560, 1996

NOGUEIRA, R. C. **Propagação in vitro, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. Lavras: UFLA, 2003. 89 p. Dissertação (Mestrado).

PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. (ed.). **Cultura de Tecidos – Textos Acadêmicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97 p.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PHAN, C. T.; DO, C. B.; HEGEDUS, P. Metabolic aspects of “in vitro” culture of plants; problems and applications, comparison of soluble contents, marker enzymes between explant and cell suspension culture. **Experimental Biological**, v. 46, n. 3, p. 58, 1987.

PIERCE, R. The big issue. **The Strad**, n. 8, p. 840-843, 2002.

PIERIK, R. L. M. **Plantenteelt in kweekbuizen**. 2.vol. herz drunk. Wageningen: Ponsen & Looijen, 1985. 202 p.

PIERIK, R. L. M. **In Vitro Culture of Higher Plants**. Wageningen: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 344 p.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, 81:93-107, 1995.

REZENDE, C. M.; CORRÊA, V. F. S.; COSTA, A. V. M.; CASTRO, B. C. S.; ALVES R. J. V. Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.). **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 414-416, 2004.

ROBERTS, D. R.; WEBSTER, F. B.; FLINN, B. S.; LAZAROFF, W. R.; CYR, D. R. Somatic embryogenesis of spruce. In: REDENBAUGH, K., (ed.). **Synseeds**; application of synthetic seeds to crop improvement. Boca Raton, CRC Press, 1993. p. 427-452.

SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R. Habituação. **ABCTP Notícias**, n. 41, p. 4-10, 2001.

SANTIAGO, E. J. A. de. **Caracterização Morfológica e Bioquímica de Calos de Pimenta Longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**. Lavras: UFLA, 2003. 183 p. Tese (Doutorado).

SERRA, A. G. P. **Análises bioquímicas de calos e estudo da divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.)**. Lavras: UFLA, 1999. 72 p. Dissertação (Mestrado)

SCHENK, R. V.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, v.50, p.199-204, 1972.

SÖNDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W. R. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. P.; HOLLAENDER, A. (ed.). **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p. 215-232.

SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A. Citros. In: AMMIRATO, P. V.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; YAMADA, Y. (ed.). **Handbook of Plant Tissue Culture**; crop species. New York: MacMillan, 1984. v. 3, p. 355-372.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 719 p.

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

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Documento on line. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. Disponível em:
<http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-%20Jo%20E3o%20Batista%20Teixeira.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2006.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v. 1, p. 261-269.

TOWILL, L. E. Germplasm preservation. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Ed.). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, 2000. p. 337-353.

TUCKER, S. C. Floral development in legumes. **Plant Physiology**. v. 131, p. 911-926, mar. 2003.

UNIÃO INTERNACIONAL PARA CONSERVAÇÃO DA NATUREZA (IUCN). **Plants in danger. What do we Know?** Cambridge. 1986.

VENDRAME, W. A. **Embriogênese Somática em *Pinus taeda* L.** 1994. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1994.

VIEIRA, M. L. C. **Conservação de germoplasma *in vitro***. São Paulo: USP. [1999]. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/~evolucao/topicos/conserv.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2006.

WANN, S. R. Somatic embryogenesis in woody species. In: JANICK, J. **Horticultural Review**. Portland: Timber Press, 1989. v. 10, cap. 5, p. 153-81.

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

WHITE, P. R. **A handbook of plant tissue culture**. Jaques Cattell Press, Lancaster, 1943.

YEOMAN, M. M.; MACLEOD, A. J. Tissue callus cultures techniques. In: STREET, H. E. (Ed.) **Plant Tissue and Cell Culture**. Berkeley: University of Califórnia. p. 31-59. 1977.

ARTIGO I

CONTROLE DA CALOGÊNESE DO PAU-BRASIL *in vitro*

ELIAS TERRA WERNER¹

KAMILA VILAS PESSOTTI¹

JÉSSICA DE ALMEIDA ROGER²

GERALDO ROGÉRIO FAUSTINI CUZZUOL³

¹ Mestrando em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória- ES. E-mail: elias_werner@ig.com.br; k_pessotti@hotmail.com

² Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). E-mail: fefe_ufes@yahoo.com.br; jessiebio@yahoo.com.br

³ Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória-ES. E-mail: gcuzzuol@gmail.com

Submetido à Revista *Árvore* em 09 de maio de 2008.

Revisado em 25 de janeiro de 2009.

Reenviado em 26 de janeiro de 2009.

Aceito em 25 de fevereiro de 2009.

CONTROLE DA CALOGÊNESE DO PAU-BRASIL *in vitro*

RESUMO - Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. A indução da calogênese é a primeira etapa para obtenção de embriões e sementes. Para o controle da calogênese de *Caesalpinia echinata*, foram usados discos de foliólulos do pau-brasil em diferentes fases de desenvolvimento combinados com os fitorreguladores 2,4-D (0, 5, 10, 20, 50, 100 mg/L) e 6-BAP (2,0 mg/L) cultivados em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) acrescido de sacarose (30 g/L), mio-inositol (100 mg/L) e ágar (7,5 g/L). Foi testado, também, o efeito de 6-BAP (0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 e 10 mg/L) no crescimento de ápices meristemáticos. Foliólulos juvenis cultivados com baixa concentração de 2,4-D (5 e 20 mg/L) e foliólulos jovens tratados com altas concentrações de 2,4-D (50 e 100 mg/L) geraram calos sem diferenças significativas entre luz e escuro. Quanto ao controle da oxidação, melhores resultados foram proporcionados pelo carvão ativado, porém, inibitório à calogênese. A transferência dos calos do meio de cultura MS com altas concentrações de 2,4-D (5,0; 10,0 e 20,0 mg/L) para meio sem fitorreguladores estimulou a formação de massas pró-embriônicas (MPEs). Os meios livres de fitorreguladores, 2,0 mg/L de 2,4-D e 0,5 mg/L de 2,4-D elevou o número de calos embriogênicos e de massas pré-embriônicas. Somente em 0,5 mg/L 2,4-D verificou-se algumas estruturas semelhantes à embriões somáticos na fase globular e codiforme.

Palavras-chaves: *Caesalpinia echinata*, calos, oxidação.

In vitro CALOGENESIS CONTROL OF PAU-BRASIL

ABSTRACT - *In vitro* control of callogenesis of brazilwood. The induction of callogenesis is the first step to obtain embryos and seeds. In order to control the callogenesis of *Caesalpinia echinata*, leaf discs of brazilwood in different developmental stages were used combined with the growth regulators 2,4-D (0, 5, 10, 20, 50, 100 mg/L) and 6-BAP (2,0 mg/L) cultivated in medium Murashige and Skoog (1962) supplemented with sucrose (30 g/L), myo-inositol (100 mg/L) and agar (7,5 g/L). The effect of 6-BAP (0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 and 10 mg/L) on the growth of meristematic shoot apex was also tested. Juvenile leaves cultured with low concentrations of 2,4-D (5 e 20 mg/L) and young leaf treated with high concentrations of 2,4-D (50 and 100 mg/L) produced callus without significant differences between light and dark. As for the control of oxidation, best results were provided by activated charcoal, however, inhibitory to callogenesis. The transfer of callus from MS culture medium with high concentrations of 2,4-D (5,0, 10,0 and 20,0 mg/L) to medium without growth regulators stimulated the formation of pro-embryonic masses (PEMs). Medium without growth regulators, 2,0 mg/L of 2,4-D and 0,5 mg/L of 2,4-D increased the number of embryogenic calluses and pre-embryonic masses. Only at 0,5 mg/L 2,4-D there were structures similar to global and heart shaped somatic embryos.

Key words: *Caesalpinia echinata*, callus, oxidation.

1.Introdução

Caesalpinia echinata Lam (Fabaceae), conhecida popularmente como pau-brasil, é planta semidecídua e semi-heliófila da Floresta Estacional Caducifólia Costeira (CARVALHO, 1994; AGUIAR et al., 2005) distribuída na costa brasileira entre Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte (LIMA, 1992). A sua exploração predatória na época da colonização aliada às características recalcitrantes de suas sementes (BARBEDO et al., 2002) contribuíram para que *C. echinata* fosse incluída na lista de espécies ameaçadas ou em perigo de extinção (BRASIL, 1992; AGUIAR et al., 2007).

Uma das estratégias eficientes para promover a conservação de espécies ameaçadas consiste na criação de banco de germoplasma *in situ* e *ex situ*. Nesse último caso, um método bastante conhecido é a propagação de plantas *in vitro* através da indução de embriões somáticos ou regeneração de plantas por cultivo de ápices meristemáticos (GUERRA et al., 1999).

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

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

Além da definição da composição química para o controle da organogênese *in vitro*, um outro desafio encontrado nas técnicas de micropropagação é o controle da oxidação (PREECE e COMPTON, 1991). As substâncias oxidantes mais comumente encontradas em algumas espécies lenhosas cultivadas *in vitro* são os fenóis, flavonóides e taninos (PAIVA e PAIVA, 2001) bastante representativos em tecidos de arbóreas tropicais (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A idade e a fase de desenvolvimento dos explantes são outros fatores associados à síntese dos compostos fenólicos. De modo geral, explantes mais jovens são menos propícios à oxidação (PAIVA e PAIVA, 2001).

Algumas medidas têm sido recomendadas para evitar a oxidação dos explantes, como a imersão em soluções antioxidantes de ácido cítrico e/ou ácido ascórbico antes da inoculação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), adição de carvão ativado, ácido ascórbico e/ou polivinilpirrolidone (PVP) ao meio de cultura (PAIVA e PAIVA, 2001).

O trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para indução e controle do desenvolvimento de calos visando a embriogênese somática indireta. Estabeleceu, ainda, condições ideais para o controle da oxidação de explantes foliares de *C. echinata* quando cultivados *in vitro*.

2. Material e Métodos

2.1 Material biológico: Foram utilizados como explantes foliólulos de *Caesalpinia echinata* Lam (Fabaceae) retirados de uma árvore adulta, com aproximadamente 6 anos de idade, do Parque Municipal Pedra da Cebola (20°19'09"S, 40°20'50"W), Vitória-ES. Foi selecionado um genótipo com as melhores características morfológicas e fisiológicas de onde foram retiradas folhas basais e da borda da copa que apresentassem foliólulos na fase juvenil, jovem e adulto do desenvolvimento (Figura 1). As folhas foram acondicionadas em sacolas plásticas, umedecidas e transportadas imediatamente para o Laboratório de Micropropagação de Plantas da Universidade Federal do Espírito Santo, distante 200 metros do local de coleta. Os explantes foram coletados no período de 17/01/2006 a 12/04/2006 quando as árvores se encontravam na fase de crescimento vegetativo.

2.2 Indução da Calogênese: Testou-se o efeito de seis concentrações de 2,4-D (0, 5, 10, 20, 50 e 100 mg/L) na indução de calos utilizando-se foliólulos juvenis, jovens e adultos (Figura 1A, 1B e 1C) que após inoculado em meio de cultura, foram cultivados sob luz ou escuro constante em um esquema fatorial 6x3x2 (2,4-D x fase de desenvolvimento x luz/escuro) com n=10. O meio de cultura utilizado foi o MS completo (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 30 g/L de sacarose, 7,5 g/L de agar (Vetec®) e 100 mg/L de mio-inositol. Adicionou-se as vitaminas tiamina-HCl (100µg/L), piridoxina-HCl (250 µg/L) e ácido nicotínico (250µg/L) e o aminoácido glicina (4 mg/L). 10 mL do meio de cultura foi vertido em frascos de vidro (40 mL) e esses foram, primeiramente, vedados com papel insulfilm PVC e depois fechados com papel alumínio. O pH foi ajustado em 5,8 utilizando-se soluções de KOH e/ou HCl 1,0 M, antes da autoclavagem a 120°C e 1 atm por 20 minutos.

Os foliólulos foram lavados com detergente neutro em água corrente durante 10 minutos para pré-limpeza e lixiviação de compostos fenólicos. A desinfestação e a inoculação dos explantes foram realizadas na câmara de fluxo laminar. Os explantes foram desinfetados em álcool etílico 70% por 2 minutos e transferidos para solução de hipoclorito de sódio comercial 40% (v/v) durante 20 minutos, sob agitação constante, e enxaguados três vezes com água destilada estéril. Dos foliólulos foram retirados discos de 0,7 cm de diâmetro na região da nervura

central com o auxílio de um perfurador de rolha. O material foi inoculado em meio de cultura e mantido em sala de crescimento, à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob luz ($50\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$) ou escuro contínuo por 56 dias quando foi calculada a porcentagem de calos formados.

2.3 Antioxidantes: Além do controle (MS sem adição de antioxidantes), foram testados os efeitos do carvão ativado (2 g/L), ácido cítrico (150 mg/L) e ácido ascórbico (150 mg/L) no meio MS completo e com as vitaminas e o aminoácido nas mesmas concentrações utilizadas para induzir a calogênese, suplementado também com 10 mg/L de 2,4-D e 2,0 mg/L de 6-BAP. No controle da oxidação, discos de foliólulos jovens foram inoculados com a superfície abaxial voltada para o meio, onde dez amostras foram mantidas na luz e dez no escuro constante. O delineamento experimental utilizado seguiu o esquema fatorial 4x2 (tratamentos x luz/escuro) e os parâmetros analisados foram a coloração da superfície adaxial do explante e a porcentagem de calos formados. O escurecimento (oxidação) foi calculado em porcentagem utilizando-se o padrão de classificação apresentado na Figura 1D, 1E e 1F, consistindo-se em níveis de oxidação baixa, média e alta.

2.4 Indução de embriões somáticos: Calos de *C. echinata* com aproximadamente 30 a 45 dias, previamente cultivados em meio MS com 5 a 20 mg/L de 2,4-D foram cultivados por 30 dias em meio MS sem fitorreguladores para eliminar o efeito residual do 2,4-D. Os calos foram repicados e transferidos para 6 tratamentos, sendo T1: meio MS sem fitorreguladores (controle), T2: MS + 2,0 mg/L 2,4-D, T3: MS + 2,0 mg/L 2,4-D + 3,0 mg/L 6-BAP (6-benzilaminopurina), T4: MS + 2,0 mg/L 2,4-D + 8,0 mg/L 6-BAP, T5: MS + 3,0 mg/L 6-BAP e T6: MS + 8,0 mg/L 6-BAP. A cada 30 dias os calos eram repicados a fim de renovar o meio de cultura e assim evitar a oxidação e a depleção excessiva de nutrientes no meio. Após 75 dias de cultivo os calos foram transferidos para novos meios de cultura onde a concentração de 6-BAP foi reduzida a 10% do valor inicial enquanto a concentração de 2,4-D foi reduzida à 25% do valor inicial. No caso dos tratamentos em que há combinação de 2,4-D e 6-BAP, apenas a concentração de 2,4-D foi reduzida em 25% como se segue: T7: MS + 0,5 mg/L 2,4-D, T8: MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 3,0 mg/L 6-BAP, T9: MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 8,0 mg/L 6-BAP, T10: MS + 0,3 mg/L 6-BAP e T11: MS + 0,8 mg/L 6-BAP.

Foram avaliadas as colorações dos calos (translúcido, verde, marrom e marrom oxidado), presença de estruturas filamentosas, massas pró-embriogênicas (MPEs) e embriões somáticos (Figura 1G-1L).

2.5 Organogênese direta: Segmentos de ápices caulinares foram isolados e inoculados em meio de cultura MS completo, suplementado com as vitaminas e o aminoácido utilizados na indução da calogênese. A assepsia dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar

com a imersão dos explantes em álcool etílico 70% por 1 minuto, seguido de imersão em solução comercial de hipoclorito de sódio com 3–5% de cloro ativo, durante 20 minutos, em constante agitação, seguida de três enxágües de água destilada estéril. Os tratamentos consistiram em adicionar ao meio de cultura as concentrações de 0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 e 10 mg/L 6-BAP. Antes da adição do ágar, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e autoclavado por 20 minutos à 121°C. Sob estereomicroscópio, foram excisados os segmentos de ápices com aproximadamente 0,5 cm de comprimento.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software ASSISTAT. Para a comparação das médias foi usado o teste Tukey no nível de 1% de probabilidade.

3.Resultados

A indução de calos em *C. echinata* ocorreu entre 7 a 21 dias após a inoculação, iniciando o processo de dediferenciação na nervura central e na borda dos discos (dados não apresentados). A calogênese só ocorreu em presença de 2,4-D, independente das condições de luminosidade (Tabela 1, Figura 2). As respostas às concentrações de 2,4-D foram associadas à fase de desenvolvimento dos explantes. Melhores respostas ocorreram em foliólulos juvenis nas concentrações mais baixas de 2,4-D (5 a 20 mg/L) e foliólulos jovens nas concentrações mais elevadas (50 e 100 mg/L)(Tabela 1).

A utilização de substâncias antioxidantes e a ausência de luz não foram eficientes no controle do processo degenerativo dos calos (Figura 3). O melhor tratamento no controle de oxidação foi o carvão ativado em que 40% dos explantes apresentaram oxidação baixa a moderada, porém, sem formação de calos. No entanto, foi na presença de ácido ascórbico no escuro que ocorreu maior desenvolvimento de calos, onde 85% dos explantes geraram calos (Figura 4).

De maneira geral, calos embriogênicos são identificados pela sua coloração. As porções translúcida-brancas ou amareladas dos calos são consideradas friáveis e com potencial para formar embriões somáticos (GUERRA et al., 1999; IPEKCI e GOZUKIRMIZI, 2005; ARUNYANART e CHAITRAYAGUN, 2005). Independente dos tratamentos, a maioria dos calos apresentou coloração heterogênea podendo identificar áreas de cores translúcido, marrom-amarelado e verde (Figura 1, Tabela 2). Tanto as porções translúcidas e verdes se mostraram friáveis e embriogênicas devido à presença de estruturas globulares pró-embriogênicas (Figura 1H e 1I), enquanto as porções marrom-amareladas apresentaram aspecto gelatinoso e amorfo sem formação de massas pró-embriogênicas.

Nas duas fases do experimento de indução de embriões somáticos (elevada e baixa concentração de fitorreguladores), maior porcentagem de calos apresentando regiões

translúcidas, marrom e verde foram observadas em baixas concentrações de 2,4-D. A combinação de 2,4-D e de 6-BAP elevou a porcentagem de calos translúcidos e marrons. Porém, quando cultivados em meio contendo apenas 2,4-D, predominaram calos com tonalidade translúcido e verde. Os calos de *C. equinata* cultivados nos diferentes tratamentos formaram massas pró-embriônicas (MPEs) (Figuras 1G, 1H e 1I). Somente em 0,5 mg/L 2,4-D apenas 10% dos calos apresentaram estruturas semelhantes aos embriões somáticos globulares e codiformes (Figura 1I).

No experimento de organogênese direta os ápices caulinares, utilizados como explantes, desenvolveram calos em todas as concentrações de 6-BAP. Ocorreu, também, o crescimento de células com colorações esverdeadas, provavelmente originadas da região meristemática, sugerindo que a organogênese possa ter iniciado (dados não apresentados).

4. Discussão

Os resultados demonstrados na Tabela 1 para indução da calogênese, confirmam descrições citadas na literatura ao afirmarem que a fase de desenvolvimento dos explantes tem grande influência nos processos de desdiferenciação celular e de que órgãos jovens são os mais indicados como fonte doadora de explantes (THORPE e PATEL, 1984). Segundo Fouda (1996), folhas de ramos juvenis apresentam epiderme recoberta por uma fina camada de cutícula com alta densidade estomatal e mesofilo espesso em relação às folhas adultas. A maior sensibilidade dos foliólulos jovens em baixas concentrações de 2,4-D pode ser devido à juvenildade de seus tecidos caracterizados por elevados níveis endógenos de auxinas (TAIZ e ZEIGER, 2003).

O desenvolvimento de calo pode ser independente de auxinas e citocininas, dependente de auxinas, dependente de citocininas ou dependente de ambas (JAIND et al., 1995). Para *C. echinata*, a calogênese foi dependente da concentração da auxina 2,4-D interagindo com a fase de desenvolvimento dos foliólulos. Segundo Grattapaglia e Machado (1990), alta razão auxina/citocininas estimula a proliferação celular culminando na formação de calos. Essa combinação não foi testada em *C. echinata* devido à não formação de calos em meio MS suplementado apenas com 6-BAP (dados não apresentados).

Considerando os resultados no controle da oxidação (Figura 3), de acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o carvão ativado em concentrações de 0,1 a 2% pode ser benéfico simulando o escuro onde os explantes se desenvolvem melhor. No entanto, o carvão ativado tem efeito adsorvente, imobilizando parte dos elementos que compõem o meio, inclusive os fitorreguladores. Nesse caso, o aumento da concentração de auxinas tem sido indicado como

uma estratégia para contornar o problema. Aumentando a concentração de 2,4-D em 50 vezes passando de 10 μM (sem carvão ativado) para 500 μM (com 0,3% de carvão ativado) Teixeira et al. (1993) conseguiram resultados satisfatórios em palmeiras-de-óleo (*Elacis guineenses*). Resultado semelhante foi verificado por Biasi et al. (1994), trabalhando com a propagação do abacateiro *in vitro*; o ácido ascórbico e o ácido cítrico também não foram eficientes no controle da oxidação de *C. echinata*.

A oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo, da fase de desenvolvimento da planta e da estação do ano. Em épocas do ano mais favoráveis ao crescimento, a concentração de polifenóis é menor e, conseqüentemente, é menor a oxidação nos tecidos cultivados *in vitro* (PAIVA e PAIVA, 2001). No presente estudo, os explantes utilizados foram foliólulos em fase jovem de desenvolvimento que podem apresentar maiores níveis de substâncias oxidantes em relação aos foliólulos juvenis (PAIVA e PAIVA, 2001). Além disso, a fase de desenvolvimento da planta matriz pode ter grande influência no processo de oxidação. A época de coleta dos foliólulos de *C. echinata* ocorreu no verão e, de acordo com a sua fenologia, corresponde à fase de reprodução sexuada como confirmada pela visualização de estruturas reprodutivas nas plantas matrizes por ocasião da coleta. Assim, a oxidação fenólica dificultou a prática de micropropagação de *C. echinata in vitro*.

Com relação à coloração dos calos (Tabela 2), a presença de porções esverdeadas nestes pode ser atribuída à exposição dos calos à luz constante, o que desencadeou a síntese de pigmentos de clorofila nas células de calos translúcidos (CORREDOIRA et al. 2002).

A expressão da embriogênese somática pode ser desencadeada por diferentes fatores dependendo da espécie e das condições fisiológicas da planta matriz. No entanto, o procedimento mais comumente utilizado é o da exclusão ou diminuição da concentração de auxina. Segundo Zimmerman (1993), a retirada da auxina do meio de cultura provoca a inativação de uma série de genes permitindo que o programa da embriogênese dê continuidade. A aquisição de polaridade em embriões é tida com frequência como o primeiro passo no processo da embriogênese (WARREN e WARREN, 1993) e a divisão assimétrica não resulta diretamente em um embrião e sim em MPEs as quais apenas algumas irão se desenvolver em embriões (NUTI RONCHI e GIORGETTI, 1995). O restante das MPEs deve ter sido eliminado pela morte celular programada (FILONOVA et al., 2000).

Para algumas espécies, a redução da razão auxinas/citocininas é necessária para a indução da embriogênese somática (GRAY, 2000). Nesse aspecto, Myers (2004) obteve MPEs e o subseqüente desenvolvimento de embriões somáticos a partir de sementes imaturas de *Delonix regia*, uma Fabaceae, em meios de cultura contendo 2,4-D (1 a 4 mg/L) combinado

com BAP (0,1 a 0,5 mg/L). Mesmo com a proximidade taxonômica entre *Delonix* e *Caesalpinia*, o balanço hormonal de auxina e citocinina não gerou embriões somáticos em *C. echinata*. Tais informações sugerem que as concentrações, ou ainda, a razão entre as concentrações de 2,4-D e 6-BAP testadas no presente trabalho não foram as ideais para a expressão da embriogênese somática. Há casos em que a associação de 2,4-D e 6-BAP não é eficiente na indução e expressão da embriogênese somática. Ipekci e Gozukirmizi (2005) conseguiram melhor produção de embriões somáticos a partir de folhas de *Paulownia elongata* (Schrophulariaceae) em meio MS contendo 0,1 mg/L de TDZ (1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)uréia]) e 1,0 mg/L de cinetina. Outros estudos como os de Junaid et al. (2006) têm demonstrado que, depois de adquirir competência embriogênica, a substituição do 2,4-D por outros fitorreguladores como o ANA podem estimular a formação de embriões somáticos. Em todos os tratamentos testados com *C. echinata* ocorreu a formação de calos com estruturas filamentosas na sua superfície (Figura 1G). Segundo Barrueto (1992) e Chaudhury e Qu (2000) essas estruturas são elementos diferenciados tais como fibras e traqueídeos indicando que estas porções dos calos não conseguiram se desdiferenciar e, por isso, não são embriogênicas.

Embora não se tenha definido a formulação para a expressão de embriões somáticos, o presente trabalho revelou que essa espécie necessita de elevadas concentrações de auxina, como o 2,4-D, para indução da calogênese. Outro aspecto relevante é de que a transferência para meio reduzido ou sem fitorreguladores induz algumas formações incipientes de MPEs. Esse mecanismo de diferenciação celular pode ser controlado, dentre outras maneiras, utilizando-se outros meios de cultura ou reduzindo as concentrações de nutrientes (ANDERSON, 1984). Além do uso de fitorreguladores, a osmolaridade associada ao ácido abscísico também pode ser uma outra alternativa para a expressão da embriogênese somática (GUERRA et al., 1999).

5. Conclusões.

Foliólulos juvenis de *C. echinata* em meio MS contendo 5 e 20 mg/L de 2,4-D e, foliólulos jovens em 50 e 100 mg/L de 2,4-D formam calos. Carvão ativado controla a oxidação e inibe a calogênese. Meio livre de fitorreguladores estimula algumas formações de massas pró-embriônicas (MPEs). Contudo, ainda não foi possível a formação de embriões somáticos, apenas algumas estruturas semelhantes aos embriões somáticos na fase globular e codiforme foram identificadas em 0,5 mg/L 2,4-D.

6.Agradecimentos

À Fundação Biodiversitas, à Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo-FAPES (Processo 39044823/2007) e ao Fundo de Apoio Científico e Tecnológico da Prefeitura Municipal de Vitória-FACITEC (Processo 38/2007) pelo apoio financeiro.

7.Referências

AGUIAR, F. F. A.; PINTO, M. M.; TAVARES, A. R.; KANASHIRO, S. Maturação de frutos de *Caesalpinia echinata* Lam., Pau-Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.1, p.1-6, 2007.

AGUIAR, F.F.A.; KANASHIRO, S.; TAVARES, A.R.; PINTO, M.M.; STANCATO, G. C.; AGUIAR, J.; NASCIMENTO, T.D.R.. Germinação de sementes e formação de mudas de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau - Brasil): efeito de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.29, n.6, p.871-875, 2005.

ANDERSON, W.C. A revised culture tissue medium for shoot multiplication of rhododendron. **Journal of American Society Horticulturæ of Science**, v.109, p.343-347, 1984.

ARUNYANART, S.; CHAITRAYAGUN, M. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). **Scientia Horticulturæ**, v.105, p.411–420, 2005.

BARBEDO, C.J.; BILIA, D.A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.4, p.431-439, 2002.

BARRUETO CID, L.P. A cultura de células vegetais em meio líquido. **ABCTP Notícias**, v.18, p.2-7, 1992.

BIASI, L.A.; KOLLER, O.C.; KAMPF, A.N. Micropropagação do abacateiro ‘Ouro Verde’ a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.7, p.1051-1058, 1994.

BRASIL. Portaria nº 006-N, de 15 de Janeiro de 1992. Dispõe sobre a Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 jan. Seção 1, v.130, n.16, 1992.

CARVALHO, J. F. R. P.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. Regeneração *in vitro* de Urucum (*Bixa Orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.29, n.6, p.887-895, 2005.

- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras – recomendações Silviculturais, Potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ/SPI, p.113-117, 1994.
- CHAUDHURY, A.; QU, R. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, n.2, p.113-120, 2000.
- CORREDOIRA, E.; VIEITEZ, M.A.; BALLESTER A. Somatic embryogenesis in Elm. **Annals of Botany**, v.89, p.637-644, 2002.
- 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**, v.113, p.4399-4411, 2000.
- FOUDA, R.A. Anatomical characteristics of juvenile and adult shoots associated with rooting ability of *Cupressocyparis leylandii* cuttings. **Horticultural Science**, v.28, p.107-111, 1996.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, v.1, p.183-260, 1998.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (ed.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, p. 99-169, 1990.
- GRAY, D.J. Nonzygotic embryogenesis. In: Trigiano, R.N. and D.J.Gray (eds.). *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. CRC Press, Boca Raton, p.175-189, 2000.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, v.2, p.537-548, 1999.
- IPEKCI, Z.; GOZUKIRMIZI, N. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.341-345, 2005.
- JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWMAN, R J. Somatic embryogenesis in woody plants. **Kluwer Academic Publishers**, v.2, 1995.

- JUNAID, A.; MUJIB, A.; BHAT, M.A.; SHARMA, M.P. Somatic embryo proliferation, maturation and germination in *Catharanthus roseus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.84, p.325–332, 2006.
- LIMA, H. C. Aspectos Botânicos do pau-brasil. In: CUNHA, M.V.; LIMA, H. C. (ed.). **Viagem à terra do pau-brasil**. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura, p.23-38, 1992.
- MODGIL, M.; SHARMA, D.R.; BHARDWAJ, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydeman's Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, v.81, p.179-188, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- MYERS, A. Somatic embryogenesis induction in *Delonix regia* (Boger.) (Royal Poinciana). **Journal of Undergraduate Research**, v.5, ed. 6, 2004.
- NEWMAN, P.O.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P.K. Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*), somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl segments induced with Benzylaminopurine. **Intr. Journal Plant Science**, v.157, p.554-560, 1996.
- NUTI RONCHI, V.; GIORGETTI, L. The cell's commitment to somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin, Springer-Verlag, v.30, p.3-19, 1995.
- PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. **Cultura de Tecidos – Textos Acadêmicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 97 p., 2001.
- PREECE, F.E.; COMPTON, M.E.I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry: High-Tech and micropropagation I**. Berlin: Springer Verlag, p.168-189, 1991.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. Auxina: o hormônio de crescimento. In: **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p. 2003.
- TEIXEIRA, J.B.; SÖNDAHL, M.R.; KIRBY, E.G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.34, 1993.
- THORPE, T.A.; PATEL, K.R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, I. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, v.1, cap.7, p.49-60, 1984.

WARREN WILSON, J.; WARREN WILSON, P.M. Mechanism of auxin regulation of structural and physiological polarity in plants, tissues, cells and embryos. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.20, 1993.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v.5, p.1411-1423, 1993.

Figuras e Tabelas



Figura 1- Aspectos morfológicos dos foliólulos juvenis (A), jovens (B) e adultos (C) de *C. echinata* utilizados como fonte de explantes e níveis de oxidação baixa (D), média (E) e alta (F) dos foliólulos cultivados *in vitro* no meio de cultura MS. Calos apresentando estruturas filamentosas (G), massas pró-embriogênicas – MPE (H) e embrião somático (ES) do tipo torpedo (I). Ápice meristemático aos 7 (J), 20 (K), 30 (L) e 60 dias (M) de cultivo *in vitro*.

Figure 1- Morphological aspects of juvenile (A), young (B) and mature leaves (C) of *C. echinata* used as explants and low (D), medium (E) and high oxidation levels (F) of leaves cultured on MS medium. Calluses presenting elongated structures (G), pro-embryogenic masses – MPE (H) and somatic embryo (ES) torpedo shaped (I). Meristematic shoot apex on the 7th (J), 20th (K), 30th (L) and 60th day (M) during *in vitro* culture.

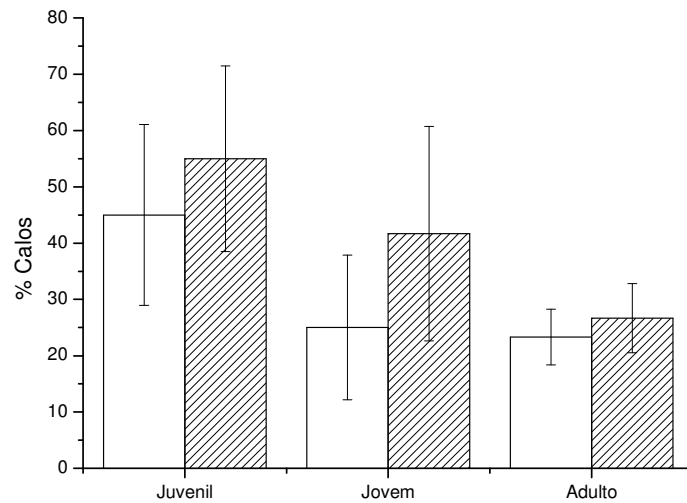


Figura 2- Porcentagem de calos formados de discos de foliólulos jovens, juvenis e adulto de *C. echinata* cultivados na luz e escuro constante aos 56 dias de cultivo em meio MS com 0, 5, 10, 20, 50 e 100 mg/L de 2,4-D (n=10). Luz (□) e escuro (▨). Barras representam o erro padrão.

Figure 2- Percentage of callus formed from juvenile, young and mature leaves of *C. echinata* cultured under constant light or dark after 56 days on MS medium with 0, 5, 10, 20, 50 and 100 mg/L of 2,4-D (n=10). Light (□) and dark (▨). Bars represent standard error.

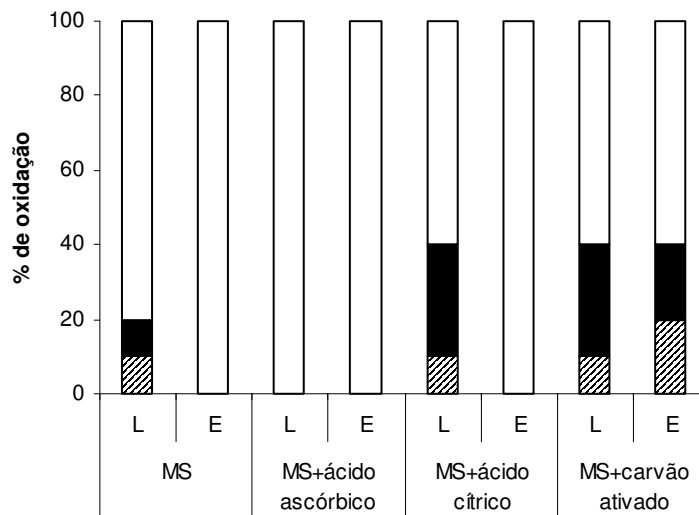


Figura 3- Porcentagem de oxidação dos discos de foliólulos jovens de *C. echinata* cultivados na luz e escuro constante e porcentagem de calos formados aos 56 dias de cultivo em meio MS com 10 mg/L 2,4-D e 2,0 mg/L de 6-BAP e suplementado com 150 mg/L ácido ascórbico, 150 mg/L ácido cítrico e 2 g/L carvão ativado. (n=10). Oxidação alta (□), média (■) e baixa (▨).

Figure 3- Percentage of oxidation on young leaves of *C. echinata* cultured under constant light (L) or dark (E) and the percentage of callus formed after 56 days on MS culture media with 10 mg/L 2,4-D and 2,0 mg/L 6-BAP and supplemented with 150 mg/L of ascorbic acid, 150 mg/L of citric acid or 2 g/L of activated charcoal. (n=10). High (□), medium (■) and low (▨) oxidation.

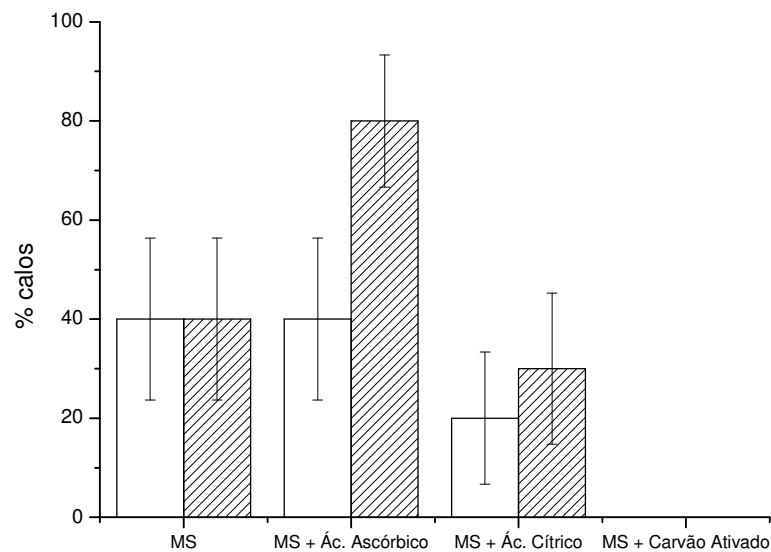


Figura 4- Porcentagem de calos formados de discos de foliólulos jovens de *C. echinata* cultivados na luz e escuro constante aos 56 dias de cultivo em meio MS com 10 mg/L 2,4-D e 2,0 mg/L de 6-BAP suplementado com 150 mg/L ácido ascórbico, 150 mg/L ácido cítrico e 2 g/L carvão ativado (n=10). Luz (□) e escuro (▨). Barras representam o erro padrão.

Figure 4- Percentage of callus formed on discs from young leaves of *C. echinata*, cultured under constant light or dark after 56 days on MS culture media with 10 mg/L 2,4-D and 2,0 mg/L BAP, supplemented with 150 mg/L of ascorbic acid, 150 mg/L of citric acid and 2 g/L of activated charcoal (n=10). Light (□) and dark (▨). Bars represent standard error.

Tabela 1- Porcentagem de calos formados utilizando-se discos de foliólulos juvenil, jovem e maduro de desenvolvimento de *C. echinata* inoculados em meio MS contendo 0, 5, 10, 20, 50 e 100 mg/L de 2,4-D após 56 dias de cultivo. Letras semelhantes não diferem pelo teste de Tukey (P<1%) onde letras minúsculas comparam dentro de coluna e maiúsculas na linha.

Table 1- Percentage of callus formed on discs from juvenile, young and mature leaves of *C. echinata* inoculated on MS media containing 0, 5, 10, 20, 50 and 100 mg/L of 2,4-D after 56 days in culture. Similar letter do not differ by Tukey Test (P<1%) where lowercase compare within column and capitals in the line.

Formação de calos (%)			
2,4-D mg/L	Juvenil	Jovem	Maduro
0	0 bA	0 bA	0 bA
5	75 aA	0 bC	35 aB
10	90 aA	5 bB	30 abB
20	85 aA	10 bB	35 aB
50	30 bB	75 aA	20 abB
100	20 bB	65 aA	30 abB

Tabela 2- Porcentagem da coloração dos calos de *C. echinata* aos 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com 2,4-D e 6-BAP e 30 dias pós a transferência para meio MS com 2,4-D reduzido à 25% valor inicial e 6-BAP reduzido à 10% do valor inicial (n=10). T = translúcido, V = verde, M = marrom e MO = marrom oxidado. Letras semelhantes não diferem pelo teste de Tukey ($P < 1\%$) onde letras minúsculas comparam dentro de coluna e maiúsculas na linha.

Table 2- Color percentage of callus after 45 days of culture on MS media with 2,4-D reduced to 25% of the initial concentration and BAP reduced to 10% of the initial concentration (n=10). T = translucent, V = green, M = brown and MO = oxidized brown. Similar letter do not differ by Tukey Test ($P < 1\%$) where lowercase compare within column and capitals in the line.

Coloração de calos (%)						
Tratamento	T/M/V	T /M	T/V	M/V	M	MO
45 dias de cultura						
Controle	100 aA	0 bC	0 bC	0 bA	0 bA	0 bA
2,0 mg/L 2,4-D	50 aB	0 bC	40 aA	10 bA	0 bA	0 bA
2,0 mg/L 2,4-D e 3,0 mg/L BAP	10 bC	40 aA	0 bC	20 bA	10 bA	20 bA
2,0 mg/L 2,4-D e 8,0 mg/L BAP	60 aB	20 bB	0 cC	0 cA	20 bA	0 cA
3,0 mg/L BAP	70 aAB	30 bAB	0 cC	0 cA	0 cA	0 cA
8,0 mg/L BAP	50 aB	0 bC	10 bB	10 bA	20 bA	0 bA
30 dias após a transferência em nova composição de reguladores						
Controle	100 aA	0 bB	0 bB	0 bA	0 bB	0 bB
0,5 mg/L 2,4-D	56 aB	08 cB	32 bA	10 cA	0 cB	0 cB
0,5 mg/L 2,4-D e 3,0 mg/L BAP	0 cD	38 aA	13 bB	12 bA	12 bB	25 aA
0,5 mg/L 2,4-D e 8,0 mg/L BAP	33 aC	33 aA	11 b B	11 bA	12 bB	0 bB
0,3 mg/L BAP	56 aB	44 aA	0 bB	0 bA	0 bB	0 bB
0,8 mg/L BAP	67 aB	0 cB	0 cB	0 cA	33 bA	0 cB

ARTIGO II

MEIOS DE CULTURA, FONTES NITROGENADAS E REGULADORES DE CRESCIMENTO NA CALOGÊNESE DE PAU-BRASIL *in vitro*

Elias Terra Werner^{1*}; Kamila Villas Pesotti¹; Thiele Arpini Gaburro¹; Camilla Rozindo Dias
Milanez¹; Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Av. Fernando Ferrari, 514, Campus Universitário, Goiabeiras, 29075-910, Vitória (ES).

*Autor correspondente: <elias_werner@ig.com.br>

Artigo nas normas da Revista Scientia Agrícola.

MEIOS DE CULTURA, FONTES NITROGENADAS E REGULADORES DE CRESCIMENTO NA CALOGÊNESE DE PAU-BRASIL *in vitro*

RESUMO: Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de meios de cultura, fontes nitrogenadas e a interação entre auxinas e citocininas no controle e no crescimento dos calos de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) *in vitro* visando a indução da embriogênese somática. Além de, realizar análises histológicas para comprovar tal processo organogênico. A indução de calos foi realizada utilizando como explantes foliólulos juvenis de pau-brasil, inoculados em MS suplementado com 20 mg/L de 2,4-D. Fragmentos de aproximadamente $0,1 \pm 0,02$ g de massa fresca foram utilizados para a análise dos diferentes meios de cultura (MS, B5, White e WPM), efeitos dos compostos nitrogenados e sua interação (NH_4NO_3 , KNO_3 e glutamina) e a interação entre auxinas (2,4-D, AIA e AIB) e citocininas (BAP e KIN). No experimento testando a interação das auxinas, 2,4-D, AIA e AIB, com as citocininas, 6-BAP e KIN, o meio de cultura foi o MS modificado, empregando apenas o nitrato de amônio (NH_4NO_3) como única fonte de nitrogênio. Com relação aos meios testados, MS, B5 e White não diferenciaram entre si estatisticamente. No entanto, o meio WPM apresentou valores significativamente diferente em relação aos outros 3 meios (MS, B5, White). Nas fontes de nitrogênio testadas e suas interações, o tratamento tendo como única fonte o NH_4NO_3 estimulou melhores resultados de massa fresca e seca aos 60 dias de cultivo. A interação entre auxinas e citocininas, de modo geral, não houve diferença estatística entre os tratamentos. No entanto, os tratamentos com 2,4-D foram os que possibilitaram maior produção de massa fresca dos calos sendo a concentração de 0,5 mg/L de 2,4-D associada a 5,0 mg/L BAP proporcionou melhor resultado. A análise histológica nos calos mostrou que não houve a formação de embriões somáticos nos calos de pau-brasil. Porém, verificou-se que a calogênese em pau-brasil ocorre na superfície adaxial dos foliólulos, resultado da proliferação das células do parênquima clorofiliano. Os calos apresentaram coloração variando do amarelo escuro a marrom, mostrando aspecto friável, não embriogênico, e com acúmulo de conteúdo fenólico. Observou-se ainda a presença de áreas meristemáticas (meristemóides), mostrando que calos de pau-brasil são competentes, embora não embriogênicos.

Palavras-chave: *Caesalpinia echinata*, cultura de tecidos, nitrogênio, auxinas, citocininas.

CULTURE MEDIA, NITROGEN SOURCES AND GROWTH REGULATORS ON THE CALOGENESIS OF BRAZILWOOD *in vitro*

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of culture media, nitrogen sources and the interaction between auxins and cytokinins in control and growth of callus of brazilwood (*Caesalpinia echinata*) *in vitro* to the induction of somatic embryogenesis. Besides, histological analysis to confirm this organogenic process. Induction of callus was carried out using juvenile leaf explants, inoculated on MS supplemented with 20 mg/L 2,4-D. Fragments of approximately 0.1 ± 0.02 g of fresh weight were used for the analysis of different culture media (MS, B5, WPM and White), effects of nitrogen compounds and their interaction (NH_4NO_3 , KNO_3 and glutamine) and interaction between auxin (2,4-D, IAA and IBA) and cytokinins (BAP and KIN). In the experiment testing the interaction of auxin, 2,4-D, IAA and IBA, the cytokinins, 6-BAP and KIN, the culture medium was changed to MS, using only the ammonium nitrate (NH_4NO_3) as sole source of nitrogen. Regarding the media tested, MS, B5 and White did not differ statistically. However, the means WPM showed significantly different values for the other 3 media (MS, B5, White). The sources of nitrogen tested and their interactions, treatment with a single source the best results of NH_4NO_3 stimulated fresh and dry weight at 60 days of cultivation. The interaction between auxin and cytokinin, in general, there was no statistical difference between treatments. However, the treatments with 2,4-D were the highest possible production of fresh weight of callus and the concentration of 0.5 mg/L 2,4-D combined with 5.0 mg/L BAP gave better results. Histological analysis showed that the callus was not the formation of somatic embryos in calli of brazilwood. However, it was found that the callus in brazilwood occurs on the surface of adaxial foliólulos a result of proliferation of parenchymal cells. The callus showed color ranging from yellow to dark brown, friable showing respect, not embryogenic, and accumulation of phenolic content. It was also observed the presence of meristematic areas (meristemoids), showing that callus of brazilwood are competent, although embryogenic not.

Key words: *Caesalpinia echinata*, tissue culture, nitrogen, auxin, cytokine.

INTRODUÇÃO

Os meios nutritivos utilizados na propagação de plantas *in vitro* fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento de órgãos e das plantas *in vitro* (Elkonin & Pakhomova, 2000; Moreira et al., 2007; George, 2008). A composição química dos meios baseia-se nas exigências nutricionais das plantas, com algumas modificações para atender às necessidades específicas quando cultivadas *in vitro* (Araújo et al., 2005).

Os meios de cultura mais conhecidos nas técnicas de micropropagação são o MS desenvolvido por Murashige & Skoog (1962), o WPM (Woody Plant Medium), formulado por Lloyd & McCown (1981), o B5 estabelecido por Gamborg et al. (1968) e o White (White, 1943), os quais diferem, principalmente, na concentração final dos sais utilizados.

O componente chave dos meios nutritivos é o nitrogênio, elemento essencial nos processos fisiológicos e bioquímicos associados ao controle do crescimento, diferenciação e morfogênese (Durzan, 1985). Pode ser fornecido na forma de nitrato (Reinert et al., 1967), amônio (Gamborg, 1970; Gamborg & Shyluk, 1970) ou aminoácidos (Caldas et al., 1990), dentre eles a glutamina, que é o precursor dos aminoácidos (Mercier & Kerbauy, 1998). A combinação dessas fontes nitrogenadas também tem proporcionado bons resultados na regeneração de plantas *in vitro* (Mercier & Kerbauy, 1998; Yatazawa & Furuhashi, 1968; Sargent & King, 1974).

Em relação aos reguladores de crescimento, a composição, a concentração e o balanço são fatores determinantes na diferenciação celular, no crescimento e no padrão de desenvolvimento *in vitro* de tecidos e órgãos (Araújo et al., 2005; Pasqual, 2001). Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados para a embriogênese somática estão a auxina (Titon et al., 2007; Motoike et al., 2007) e a citocinina (Santos et al., 2005; Hatanaka et al.,

1991), assim como, a combinação e diferentes balanços entre estes (Araújo et al., 2005; Erig et al., 2002; Junaid et al., 2007).

As auxinas são substâncias que controlam o crescimento e alongação celular (Taiz & Zeiger, 2003), são também responsáveis por desencadear os processos de desdiferenciação (modelo indireto) e rediferenciação (modelo direto) *in vitro*, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (Guerra et al., 1999). As citocininas estimulam a divisão celular e reduzem a dominância apical (Taiz & Zeiger, 2003), contudo, *in vitro* as citocininas favorecem a produção de calo embriogênico (Chée & Cantliffe, 1988). Segundo Silveira et al. (2002) é necessário estudar a interação entre citocininas e auxinas a fim de melhorar os protocolos e otimizar o cultivo *in vitro*.

O presente trabalho tem como objetivo principal avaliar o efeito de meios de cultura, fontes nitrogenadas e a interação entre auxinas e citocininas no controle e no crescimento dos calos de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) *in vitro* visando a indução da embriogênese somática.

MATERIAL E MÉTODOS

Indução da Calogênese: Os explantes utilizados para induzir a formação de calos foram foliólulos juvenis de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), obtidos de plantas com aproximadamente 6 anos, localizadas no Campus da Universidade Federal do Espírito Santo (latitude: 20°16'36,56" S e longitude: 40°18'16" O) e no Parque Municipal Pedra da Cebola (latitude: 20°16'34,50" S e longitude: 40°17'48,97" O), situados no Município de Vitória-E.S. Os foliólulos juvenis foram inicialmente lavados em água corrente, e em condições assépticas na câmara de fluxo laminar, desinfetados por 1 minutos com álcool 70 % (v/v) seguido de imersão em solução comercial de hipoclorito de sódio a 40 % (v/v) durante 20 minutos em agitação constante. Posteriormente, o material vegetal foi enxaguado três vezes em água

destilada autoclavada. O meio de cultura MS foi suplementado com 20 mg/L de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D), sacarose (30 g/L), ágar (7,5 g/L), mio-inositol (100 mg/L), tiamina (0,1 mg/L), piridoxina-HCl (0,25 mg/L), ácido nicotínico (0,25 mg/L) e glicina (4,0 mg/L). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C, 1,1 atm durante 20 minutos. O meio foi vertido em placas de Petri (20 ml) e osexplantes inoculados, sendo as placas transferidas para sala de crescimento em ausência de luz com temperatura ajustada para 25°C±2.

Os calos gerados com 60 dias de cultivo *in vitro* foram pesados em balança analítica esterilizada sob câmara de fluxo laminar com o auxílio de pinças, bisturis e demais materiais autoclavados. Após pesagem os calos foram repicados sendo os fragmentos de aproximadamente 0,1±0,02 g de massa fresca utilizados para a análise dos diferentes meios de cultura, efeitos dos compostos nitrogenados e a interação de auxinas e citocininas.

Influência de Meios de cultura: Os calos de mesma massa fresca (0,1 g) foram transferidos para placas de Petri contendo diferentes meios de cultura (MS, B5, White e WPM) com a finalidade de determinar o efeito desses meios no crescimento dos calos e na indução de embriões somáticos.

Aos meios de cultura foi adicionado 1 mg/L de 2,4-D e 5 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP). Os calos foram isolados e transferidos de forma asséptica do meio de indução para placas de Petri contendo 20 mL dos meios de cultura básicos MS, B5, White e WPM, e acondicionados em sala de crescimento com temperatura controlada (25°C±2) e ausência de luz.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos (MS, B5, White e WPM) e 5 repetições, onde cada repetição (placas de Petri) receberam 5 calos (parcelas).

Influência de Fontes de Nitrogênio: O meio utilizado foi o MS, conforme resultado obtido do experimento anterior (influência de meios de cultura), modificando-se apenas as fontes de nitrogênio. A concentração de cada fonte foi ajustada de tal forma que a quantidade de nitrogênio fosse a mesma em cada tratamento (0,84 g/L), tendo como base a concentração de nitrogênio do meio MS conforme sugerido por Donato et al. (1999). Aos meios de cultura, foram acrescidos 2,4-D (1 mg/L) e BAP (5 mg/L).

Calos com massa de 0,1 g, produzidos pela desdiferenciação dos foliólulos foram submetidos a sete diferentes tratamentos nitrogenados. T1: NH_4NO_3 (2,4 g/L); T2: KNO_3 (6,06 g/L); T3: glutamina (4,39 g/L); T4: NH_4NO_3 (1,65 g/L) e KNO_3 (1,9 g/L); T5: NH_4NO_3 (1,65 g/L) e glutamina (1,35 g/L); T6: KNO_3 (4,11 g/L) e glutamina (1,35 g/L) e T7: KNO_3 (1,4 g/L), NH_4NO_3 (1,2 g/L) e glutamina (1,02 g/L).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições, onde cada repetição (placas de Petri) receberam 5 calos (parcelas). Sendo as placas mantidas por 60 dias em sala de crescimento com temperatura ajustada a $25^\circ\text{C}\pm 2$ em ausência de luz.

Efeito de Auxinas e Citocininas: Calos com massa de, aproximadamente, 0,1 g, produzidos pela desdiferenciação dos foliólulos foram submetidos a seis diferentes tratamentos: T1: 0,5 mg/L 2,4-D + 5,0 mg/L 6-BAP; T2: 0,5 mg/L 2,4-D + 5,0 mg/L KIN; T3: 0,5 mg/L AIB + 5,0 mg/L 6-BAP; T4: 0,5 mg/L AIB + 5,0 mg/L KIN; T5: 0,5 mg/L AIA + 5,0 mg/L 6-BAP; T6: 0,5 mg/L AIA + 5,0 mg/L KIN.

O meio de cultura foi o MS modificado, empregando apenas o nitrato de amônio (NH_4NO_3) como única fonte de nitrogênio, na concentração de 2,4 g/L. Em que foi vertido 20 ml do meio em tubos de ensaio (50 mL).

Após a inoculação dos calos, os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada ($25^\circ\text{C}\pm 2$) e ausência de luz. Em 30 dias, os calos

foram transferidos para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura com seus respectivos tratamentos.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos e 15 repetições (tubos de ensaio contendo um calo).

Nos três experimentos realizados (meios de cultura, fontes nitrogenadas, auxinas e citocininas) após a indução da calogênese foram adicionados, além dos fitorreguladores, sacarose (30 g/L), agar (7,5 g/L), mio-inositol (100 mg/L), tiamina (0,1 mg/L), piridoxina-HCl (0,25 mg/L), ácido nicotínico (0,25 mg/L) e glicina (4,0 mg/L), sendo o pH ajustado para 5,8 e os meios autoclavados a 121°C a pressão de 1,1 atm por 20 minutos.

As avaliações de massa fresca foram realizadas nos experimentos aos 30 e 60 dias após a inoculação. No final de cada experimento (60 dias) determinou-se a massa seca, após secagem por 48 h em estufa a 60°C.

Análise Histológica: Calos obtidos dos experimentos anteriores após 60 dias de inoculação, foram fixados em FAA 50 (Johansen, 1940), desidratados em série etílica crescente (50%, 60%, 70%, 90%, 95% e 100%) e incluídos em resina glicol-metacrilato (Leica Historesin®). Os blocos foram cortados transversalmente e longitudinalmente (10 µm de espessura) em micrótomo rotativo, com a utilização de navalhas de aço. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (O'Brien, 1964) e as lâminas histológicas foram montadas em resina sintética Entellan. As observações e a documentação fotográfica foram realizadas utilizando um fotomicroscópio Nikon.

Análise Estatística: Os dados de massa seca foram transformados segundo $x^{0,5}$ e submetidos à análise de variância utilizando-se o software ASSISTAT, e para a comparação das médias foi realizado o teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Na figura 1 estão apresentados os dados de massa fresca dos calos de *C. echinata* cultivados em diferentes meios de cultura. Os meios MS, B5 e White não diferenciaram entre si estatisticamente aos 30 e 60 dias de cultivo. No entanto, o meio WPM apresentou valores significativamente diferente em relação aos outros três meios (MS, B5, White), sendo o menos satisfatório no crescimento dos calos tanto aos 30 quanto aos 60 dias de cultivo.

Já em relação à massa seca dos calos aos 60 dias, inoculados em diferentes meios de cultura (Tabela 1), os resultados mostraram que em meio White obteve-se o maior valor absoluto, no entanto, o mesmo diferiu estatisticamente apenas do meio WPM. O meio WPM inibiu a produção de massa seca, e, não diferiu estatisticamente do meio MS e B5.

Na figura 2 são apresentados os resultados referentes às fontes de nitrogênio testadas isoladamente e combinadas aos 60 dias de cultivo dos calos mostrando diferença estatística na massa fresca. O tratamento tendo como fonte o NH_4NO_3 estimulou melhores resultados (0,707 g de massa fresca) aos 60 dias de cultivo. Os tratamentos com KNO_3 , e a combinação de NH_4NO_3 e glutamina foram ineficientes produzindo 0,221 e 0,209 g, respectivamente, de massa fresca.

Os calos tratados com KNO_3 + NH_4NO_3 e glutamina (T7) mostraram maior velocidade de crescimento até aos 30 dias, obtendo-se maiores valores neste período (0,4301 g de massa fresca) e decrescendo aos 60 dias (0,368 g massa fresca). Porém, sem diferença estatística em relação aos demais tratamentos. Resultado similar também foi observado com os tratamentos de KNO_3 + glutamina (T6), que quando aplicados isoladamente não beneficiaram o crescimento do calo. Quando combinados, esses compostos estimularam o crescimento aos 60 dias (0,513 g de massa fresca), valores esses abaixo do tratamento com nitrato de amônio. O tratamento com as fontes NH_4NO_3 e KNO_3 elevaram o incremento de massa fresca aos 60 dias (0,446 g de massa fresca), aparecendo como o terceiro melhor

tratamento na promoção do crescimento dos calos. Em relação a fonte orgânica, a glutamina não estimulou o crescimento do calo.

No que se refere à massa seca dos calos tratados com diferentes fontes de nitrogênio (Tabela 2), os resultados foram bastante variados. O tratamento com NH_4NO_3 favoreceu a incorporação de massa nos calos aos 60 dias. Esse resultado foi significativo em relação aos outros tratamentos, não diferindo apenas da combinação glutamina + KNO_3 . Os tratamentos com glutamina + KNO_3 e a interação entre glutamina + NH_4NO_3 + KNO_3 demonstraram resultados próximos ao NH_4NO_3 , não diferindo entre si, porém ficando abaixo deste (nitrato de amônio).

Na Figura 3, são apresentados os resultados da comparação da massa fresca de calos de pau-brasil aos 30 e 60 dias tratados com diferentes reguladores de crescimento. De modo geral, aos 30 dias não houve diferença estatística entre os tratamentos. No entanto, aos 60 dias os tratamentos com 2,4-D foram os que possibilitaram maior produção de massa fresca dos calos sendo a concentração de 0,5 mg/L de 2,4-D associada a 5,0 mg/L BAP aquela que proporcionou melhor resultado (33,61 mg de massa fresca). Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente entre si aos 60 dias.

Na Tabela 3, estão apresentados os dados de massa seca dos calos tratados com diferentes auxinas e citocininas. Assim como na massa fresca, os calos tratados com 0,5 mg/L de 2,4-D associado a 5,0 mg/L BAP mostrou maior incremento de biomassa aos 60 dias de cultivo, diferenciando estatisticamente apenas do tratamento de 2,4-D com KIN.

A análise histológica mostrou que não houve a formação de embriões somáticos nos calos de pau-brasil, submetidos aos diferentes experimentos (meios de cultura, fontes nitrogenadas e auxinas e citocininas). A calogênese ocorreu na superfície adaxial dos foliólulos (Figura 4), resultado da proliferação das células do parênquima clorofiliano (Figura 5).

Em todos os tratamentos, os calos apresentaram coloração variando do amarelo escuro a marrom (Figura 6), indicando acúmulo de compostos fenólicos. Os calos, em secção transversal e longitudinal, mostraram aspecto friável, não embriogênico, e com acúmulo de conteúdo fenólico (Figura 7 e 8). Observou-se um padrão histologicamente semelhante entre os calos, os quais apresentaram dois setores: um formado por células alongadas, altamente vacuolizadas, com acúmulo de compostos fenólicos e com espaços entre si, conferindo o aspecto friável do calo (Figura 7 e 8); e outro constituído por células pequenas, isodiamétricas e de arranjo compacto (Figura 7).

Em algumas regiões do calo, observam-se grupos de células em intensa divisão, constituindo áreas meristemáticas (meristemóides) formadas por células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso (Figura 8) e núcleo conspícuo (Figura 9).

DISCUSSÃO

Entre as Fabaceae, sobretudo em espécies lenhosas, os estudos mostram que a formação de embriões somáticos não é um processo comum e requer maior compreensão dos estímulos e condições necessárias para indução e controle desse processo (Guerra et al., 1999). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram este fato e reforçam a necessidade de novos estudos relacionados ao domínio preciso da fisiologia do desenvolvimento do pau-brasil. Nas espécies *Albizzia lebeck*, *Acacia koa*, *Albizia richardiana*, *Cercis canadensis*, *Robinia pseudoacacia*, *Genista monosperma* cv. *Rabassina*, *Cladrastis lútea*, da família Fabaceae, por exemplo, apenas explantes juvenis formaram embriões somáticos, porém, em pequena escala (Kumar et al., 2002).

Os meios MS, White e B5 mostraram-se favoráveis ao crescimento dos calos de pau-brasil, o que, segundo Caldas et al. (1998), deve-se a alta concentração salina desses meios, levando a um significativo ganho no crescimento de tecidos e células. De acordo com Grossi

(1995), o MS, White e B5 são os meios mais utilizados na micropropagação de *Eucalyptus*. A pouca diferença na concentração iônica total em relação aos meios MS, White e B5, possivelmente explica o fato de que os valores de massa fresca e seca dos calos de pau-brasil não diferiram significativamente.

Embora, o meio WPM seja bastante utilizado na promoção da calogênese (Lima et al., 2008) e organogênese (Gloke et al., 2006) *in vitro* de espécies lenhosas, no presente trabalho este meio não proporcionou ganhos significativos de massa fresca e seca em calos de pau-brasil, provavelmente por apresentar força iônica de 50% dos meios MS, White e B5 (Conceição, 2000), elevado nível de S e baixos níveis de NH_4^+ e NO_3^- (Mccown & Sellmer, 1987).

Torna-se difícil comparar diferentes meios de cultura devido à complexidade das interações entre os nutrientes minerais, fatores de crescimento, reguladores de crescimento, agentes geleificantes, e as exigências nutricionais de cada planta e o mecanismos de absorção (Williams, 1993), associado aos fatores ambientais como luz, temperatura e tipo de explante utilizado (Williams, 1999).

Todos os meios utilizados no presente trabalho (MS, White, B5, WPM) tem como principal elemento, o nitrogênio, o qual sob formas, sejam inorgânicas ou orgânicas, pode levar a diferentes efeitos no crescimento e desenvolvimento de tecidos, conforme observado no presente estudo. Nos calos de pau-brasil, o nitrato de amônio, seguido da associação de nitrato de potássio e glutamina induziram melhor crescimento. Comparando as fontes de nitrogênio glutamina e NH_4NO_3 , Mercier & Kerbauy (1998) verificaram que o nitrato de amônio elevou a produção de biomassa em plântulas de *Tillandsia pohliana* (Bromeliaceae). Embora algumas espécies cresçam *in vitro* na presença de nitrato, como única fonte de nitrogênio, tecidos e órgãos incorporam nitrogênio e crescem mais rapidamente em soluções contendo nitrato e amônio do que na presença dessas fontes isoladas (Pasqual, 2001).

Donato et al. (1999) observaram que em cana de açúcar a presença de NO_3^- e NH_4^+ estimulou tanto a formação como o crescimento dos brotos provenientes de plantas cultivadas *in vitro*. No entanto, o nitrato pode ser utilizado como única fonte de nitrogênio sem prejudicar o crescimento para algumas variedades de cana, diferente do observado em calos de pau-brasil.

O nitrato de potássio inibiu o crescimento de calos de pau-brasil. Resultados semelhantes foram observados em *Oryza sativa* (Poaceae) (Yatazawa & Furuhashi, 1968). Entretanto, segundo Caldas et al. (1990), o nitrogênio, na forma de nitrato de potássio, é considerado a principal fonte de nitrogênio para o cultivo *in vitro*.

Na tentativa de substituir nitrato de amônio por fonte orgânica (uréia), Fráguas et al. (2003), não conseguiram resultados satisfatórios quanto ao número de brotos em segmentos nodais de *Gloxinia speciosa* (Gesneriácea). Neste trabalho, observou-se que os tratamentos utilizando fontes de glutamina isolada e combinada com as fontes inorgânicas (NH_4NO_3 e KNO_3) proporcionaram resultados intermediários quanto ao crescimento dos calos de pau-brasil, exceto para o tratamento de glutamina associada ao nitrato de amônio que obteve os menores valores absolutos. A glutamina provocou morte de células em suspensões de calos de *Dactylis glomerata* (Poaceae) (George, 2008).

Isso demonstra que para determinadas culturas, as fontes orgânicas de nitrogênio (aminoácidos, uréia) não são eficientes. Porém, sua adição pode ser um caminho eficiente para prevenir a deficiência no meio, fornecendo uma fonte de nitrogênio que é imediatamente disponível às células e tecidos vegetais (Capaldi, 2002; Caldas et al., 1998).

Os resultados obtidos indicam que a inibição do crescimento dos calos de pau-brasil *in vitro* nos tratamentos com KNO_3 e, glutamina + NH_4NO_3 não foi ocasionada por deficiência de nitrogênio, pois as concentrações de N foram semelhantes em todos os meios usados (0,84

g/L). O baixo desenvolvimento dos calos do pau-brasil pode ter sido causado pela dificuldade dos calos em absorver e/ou metabolizar as fontes fornecidas.

Com relação, ao experimento realizado com diferentes auxinas e citocininas não foi verificada diferença estatística entre os tratamentos. Porém, em valores absolutos a auxina 2,4-D associada à citocinina BAP proporcionou maior produção de massa fresca em calos de pau-brasil, assim como o observado por Bonfill et al. (2002) com a espécie *Panax ginseng* (Araliaceae).

Os tratamentos com AIA resultaram nos menores valores absolutos de massa fresca aos 30 e 60 dias, provavelmente por este regulador apresentar instabilidade no meio de cultura, devido a sua inativação por fotoxidação ou pela ação da AIA-oxidase (Grattapaglia & Machado, 1998).

A adição de ambas citocininas (BAP e KIN) ao meio de cultura nas concentrações empregadas, não beneficiou o incremento de massa fresca dos calos de pau-brasil. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o excesso de citocinina no meio de cultura causa toxidez e inibição do crescimento dos tecidos. Esses dados concordam em parte com aqueles obtidos por Araújo et al. (2005) que constataram que 1 mg/L de 2,4-D associado a 2 mg/L de KIN elevou a produção de massa fresca em calos de *Coffea arabica* L. (Rubiaceae). Os mesmos autores relataram ainda que, concentrações de cinetina acima de 2 mg/L causam um decréscimo na massa fresca dos calos devido a fitotoxidez que esse regulador pode exercer com uso de concentrações mais elevadas.

Quanto à formação de calos em explantes foliares, verifica-se que tal processo é comum na superfície adaxial das folhas (Motoike et al., 2007; Nogueira, 2003). Os resultados obtidos nos foliólulos de pau-brasil reforçam esta tendência.

No presente trabalho, as características de coloração e consistência dos calos foram semelhantes às observadas por Koroch et al. (2002), em calos de *Echinacea purpurea*

(Asteraceae), submetidos a altas concentrações de citocininas e baixas de auxinas. Os calos de pau-brasil apresentaram coloração predominantemente escura e aspecto friável. De modo geral, calos compactos e de coloração translúcida são mais suscetíveis a embriogênese ou organogênese (Almeida et al., 2001; Filipii et al., 2001; Blakeway et al., 1993; Schumann et al., 1995).

Histologicamente, os calos de pau-brasil mostraram características semelhantes às referidas por Fernando et al. (2001), no que diz respeito a ocorrência de um setor com células alongadas e de arranjo frouxo e outro com células pequenas e isodiamétricas, levando a formação de meristemóides. A ocorrência de meristemóides foi registrada por diferentes autores (Lombardi et al., 2007; Trevizam, 2005; Mello et al., 2000; Saravitz et al., 1993). De acordo com Thorpe (1980), a formação de uma área meristemática, e finalmente, um órgão, está relacionada à capacidade de uma célula em responder a sinais específicos, provavelmente de natureza hormonal.

O acúmulo de compostos fenólicos em algumas regiões dos calos de pau-brasil foi uma característica expressiva. Segundo Hrubcová et al. (1988) a ação oxidativa de compostos fenólicos constitui um fator limitante no crescimento das culturas *in vitro*. Embora, no presente trabalho não tenha sido realizada análise quantitativa de fenóis nos calos, os resultados sugerem que o acúmulo destes compostos seja um dos fatores limitantes à formação de embriões somáticos.

Entre os tratamentos, o meio MS associado ao nitrato de amônio e com a adição da auxina 2,4-D e da citocinina BAP proporcionou melhor crescimento dos calos de pau-brasil *in vitro*. Além disso, a análise histológica permitiu verificar a ocorrência de várias áreas meristemáticas (meristemóides) nos calos, mostrando que estes são competentes, embora não embriogênicos. Assim, os resultados obtidos reforçam a necessidade de novos estudos

relacionados à otimização do meio, seus componentes e condições de incubação visando a expressão da embriogênese somática em pau-brasil.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Biodiversitas, à Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo-FAPES (Processo 39044823/2007) e ao Fundo de Apoio Científico e Tecnológico da Prefeitura Municipal de Vitória-FACITEC (Processo 38/2007) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. P. de; OLIVEIRA, R. P. de; DANTAS, J. L. L. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 51-54, 2001.
- ARAÚJO, J. S. de; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; LUZ, J. M. Q.; PEREIRA, A. R.; FERREIRA, A. L.; MYIADA, L. Y. Concentrações de 2,4-D e cinetina na indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 1, n. 2, p. 72-76, 2005.
- BLAKEWAY, F. C.; HERMAN, B.; WATT, M. P. Establishment of cell suspension cultures of *Eucalyptus grandis* and *E. grandis* x *camaldulensis*. **Southern African Forestry Journal**, Centurion, v. 166, p. 17-26, 1993.
- BONFILL, M.; CUSIDÓ, R. M.; PALAZÓN, J.; PIÑOL, M. T.; MORALES, C. Influence of auxins on organogenesis and ginsenoside production in *Panax ginseng* calluses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 68, p. 73-78, 2002.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPH, 1990. p. 37-63.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v. 1, p. 87-132.

CAPALDI, F. R. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Cryptomeria japonica* D. DON. “ELEGANS” cultivados *in vitro*: Análises bioquímicas e relações entre reguladores vegetais**. 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Piracicaba, 2002.

CHÉE, R. P., CANTLIFFE, D. J. Selective enhancement of *Ipomoea batatas* Poir. embryogenic and non-embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 15, p. 149-159, 1988.

CONCEIÇÃO, H. E. O. da. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de carotenóides em timbós (*Derris* sp)**. 2000. 191 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, 2000.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; CÂMARA, T. R. Variedades de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com diferentes fontes de nitrogênio. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1289-1292, 1999.

DURZAN, D. J. Nitrogen metabolism and vegetative propagation of forest trees. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (ed.). **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 256-324.

ELKONIN, L. A.; PAKHOMOVA, N.V. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 61, p. 115-123, 2000.

- ERIG, A. C.; ROSSI, A. de; FORTES, G. R. de L. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira – preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 765-770, 2002.
- FERNANDO, J. A.; MELO, M.; SOARES, M. M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomy of Somatic Embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of Biology And Technology**, Paraná, v. 44, n. 3, p. 247-255, 2001.
- FILIPPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações Morfológicas de Embriões Somáticos Obtidos a partir de Inflorescências de Bananeira. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 4, p. 711-716, 2001.
- FRÁGUAS, C. B.; CHAGAS, E. A.; FERREIRA, M. M.; CARVALHO, J. G. de; PASQUAL, M. Micropropagação de gloxínia em diferentes concentrações de nitrato de amônio e uréia. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 811-815, 2003.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, Amsterdam, n. 50, p. 151-158, 1968.
- GAMBORG, O. L.; SHYLUK, J. P. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 45, p. 598-600, 1970.
- GAMBORG, O. L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 45, p. 372-375, 1970.
- GEORGE, E. F. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In: _____. **Plant Propagation by Tissue Culture: The Technology**. New York: Springer, 2008. cap. 3, p. 65-113.
- GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus Erythronema* X *Eucalyptus Stricklandii* Cv. 'Urrbrae Gem'. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Raleigh, v. 42, p. 139–143, 2006.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v. 1, p. 183-260.
- GROSSI, F. **Adequação nutricional do meio de cultura para crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus saligna* Smith *in vitro*, procedência Ipatinga**. 1995. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Piracicaba, 1995.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1999. v. 2, p. 537-548.
- HATANAKA, T.; ARAKAWA, O.; YASUDA, T.; UCHIDA, N.; YAMAGUCHI, T. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Reports**, Berlin, s. 1, v. 10, p. 179-182, 1991.
- HRUBCOVÁ, M.; CVIKROVÁ, M.; POSPÍŠIL, F.; MERA VÝ, L.; EDER, J. Content of phenolic acids in callus culture of alfalfa (*Medicago sativa*): The effect of age and biochemical differentiation. **Biologia Plantarum**, Netherlands, v. 30, n. 5, p. 321-326, 1988.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Co., New York.
- JUNAID, A.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P.; TANG, W. Growth regulators affect primary and secondary somatic embryogenesis in Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) at morphological and biochemical levels. **Plant Growth Regulation**, Iwoa, v. 51, p. 271–281, 2007.
- KOROCH, A.; JULIANI, H. R.; KAPTEYN, J.; SIMON, J. E. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 69, p. 79-83, 2002.

- KUMAR, S.; AGRAWAL, V.; GUPTA, S. C. Somatic embryogenesis in the woody legume *Calliandra tweedii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 71, p. 77-80, 2002.
- LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA, A. A. N. Callus Induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência Agrotécnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2008.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1981.
- LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I. R. da S.; MARIA CRISTINA STOLF NOGUEIRA, M. C. S.; BEATRIZ APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *In vitro* Shoot Regeneration from Roots and Leaf Discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Paraná, v. 50, n. 2, p. 239-247, 2007.
- MCCOWN, B. H.; SELLMER, J. C. General media and vessels suitable for woody plant culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D J. (ed.). **Cell and tissue culture in forestry**, Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987, v. 2, p. 4-16.
- MELLO, M. O.; MELO, M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *Bauhinia forficata* Link Shoot Regeneration: Histological Analysis of Organogenesis Pathway. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Paraná, v. 43, n. 4, 2000.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Endogenous IAA and Cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 10, n. 3, p. 225-228, 1998.
- MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. G. de; FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M. Resposta à adubação NPK de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola em fase de aclimatização. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 17-22, 2007.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. S.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 89, p. 75–81, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2003. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, 2003.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine blue O. **Protoplasma**, Germany, v. 59, p. 368-373, 1964.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

REINERT, J.; TOZAWA, M.; SEMEROFF, S. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis *in vitro*. **Nature**, San Francisco, v. 216, p. 1215-1216, 1967.

SANTOS, A. S. de A.; MACHADO, I. S.; LEÃO, A. L.; RAMOS, A. de A. Concentrações de bap e tdz na propagação *in vitro* de Curauá (*anana erectifolius* B. Smith). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 35, p. 62-65, 2005.

SARAVITZ, C. H.; BLAZICH, F. A.; AMERSON, H. V. Histology of *in vitro* adventitious bud development on cotyledons and hypocotyls of Fraser fir. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, California, v. 118, p. 163-167, 1993.

SARGENT, P. A.; KING, J. Investigations of growthpromoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 52, p. 1747-1755, 1974.

- SCHUMANN, G.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J.; KLOCKE, E. Anatomy of somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Somatic embryogenesis and synthetic seed I**. Berlin: Springer-Verlag, 1995, p. 3-19.
- SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. de L.; FACHINELLO, J. C.; RODRIGUES, A. C.; CITADIN, I.; QUEZADA, A. C.; SILVA, J. B. da; Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob baixas concentrações e diferentes tipos de auxinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 608-610, 2002.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 719 p.
- TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 417-426, 2007.
- THORPE, T. A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture**, New York: Academic Press, 1980, p. 71-111.
- TREVIZAM, R. **Análises Histológicas e Bioquímicas em Calos de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake Cultivados *in vitro* sob Interação Nutricional de Boro e Cálcio**. 2005. 167 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba, 2005.
- WHITE, P. R. **A handbook of plant tissue culture**. Lancaster: Jaques Cattell Press, 1943.
- WILLIAMS, R. R. *In vitro* ecology – see the light, raise the temperature. In: JOHNSON, K. A.; MCFARLANE, I. J. (ed.). **Plant tissue culture at the edge of the new millennium. Proceedings of the International Association for Plant Tissue Culture and Biotechnology (Australian Branch) Sixth National Meeting**. Sydney, p. 40–52, 1999.
- WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition *in vitro* – a mechanistic approach. **Australian Journal of Botany**, Sydney, v. 41, n. 237–251, 1993.

YATAZAWA, M.; FURUHASHI, K. Nitrogen sources for the growth of rice callus tissue.

Soil Science and Plant Nutrition, Malden, v. 14, p. 73-79, 1968.

FIGURAS E TABELAS

Tabela 1 – Massa seca (mg) de calos de pau-brasil inoculados em diferentes meios de cultura aos 60 dias.

Tratamentos	Massa Seca (mg)
MS	53,54 ab
WPM	22,28 b
B5	42,96 ab
White	62,78 a

CV (%) = 29,79

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Duncan.

Tabela 2 – Massa seca (mg) de calos de pau-brasil inoculados em diferentes fontes de nitrogênio aos 60 dias.

Tratamentos	Massa Seca (mg)
NH ₄ NO ₃	54,86 a
KNO ₃	19,02 d
GLUTAMINA	27,88 cd
NH ₄ NO ₃ + KNO ₃	25,28 cd
GLUTAMINA + NH ₄ NO ₃	18,22 d
GLUTAMINA + KNO ₃	43,90 ab
GLUTAMINA + NH ₄ NO ₃ + KNO ₃	32,10 bc

CV (%) = 14,35

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Duncan.

Tabela 3 – Massa seca (mg) de calos de pau-brasil inoculados em diferentes interações entre auxinas e citocininas, aos 60 dias.

Tratamentos	Massa Seca (mg)
0,5 mg/L 2,4-D + 5 mg/L BAP	16,18 a
0,5 mg/L 2,4-D + 5 mg/L KIN	9,95 b
0,5 mg/L AIB + 5 mg/L BAP	14,00 ab
0,5 mg/L AIB + 5 mg/L KIN	9,27 ab
0,5 mg/L AIA + 5 mg/L BAP	11,43 ab
0,5 mg/L AIA + 5 mg/L KIN	9,95 ab

CV (%) =31,07

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Duncan.

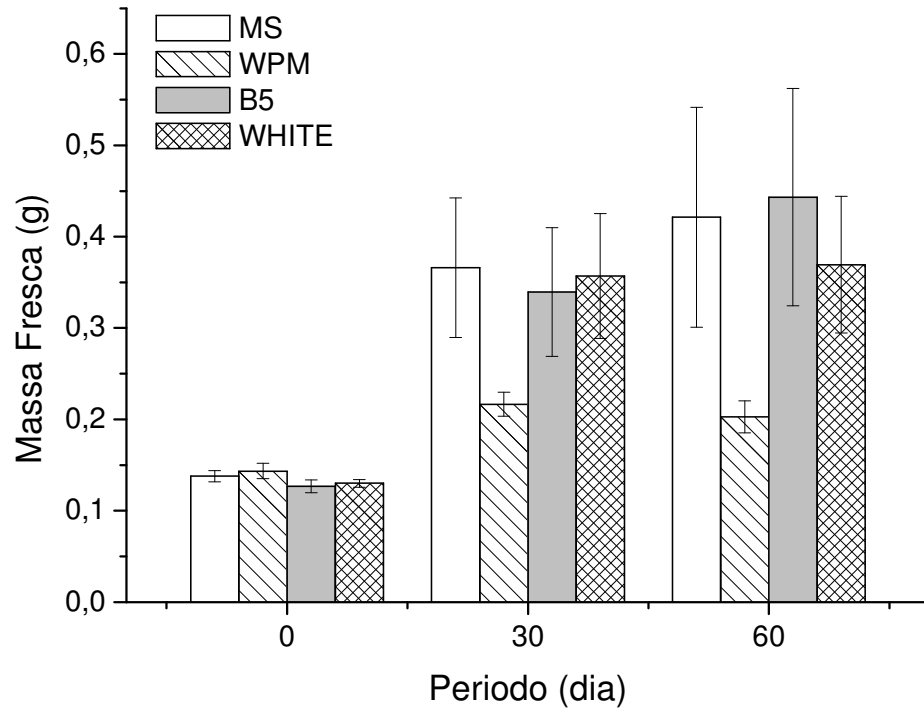


Figura 1: Massa fresca (g) de calos de *Caesalpinia echinata* cultivados em diferentes meios de cultura em diferentes tempos (dias). Barra = erro padrão.

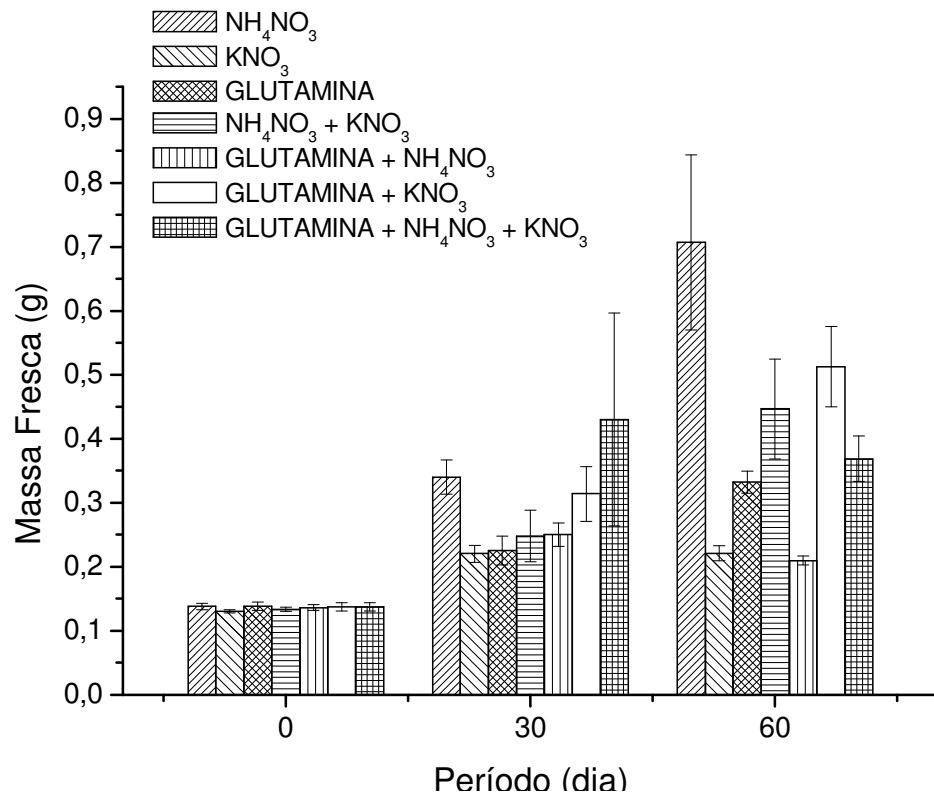


Figura 2: Massa fresca (g) de calos de *C. echinata* cultivados em diferentes fontes de nitrogênio em diferentes tempos (dias). Barra = erro padrão.

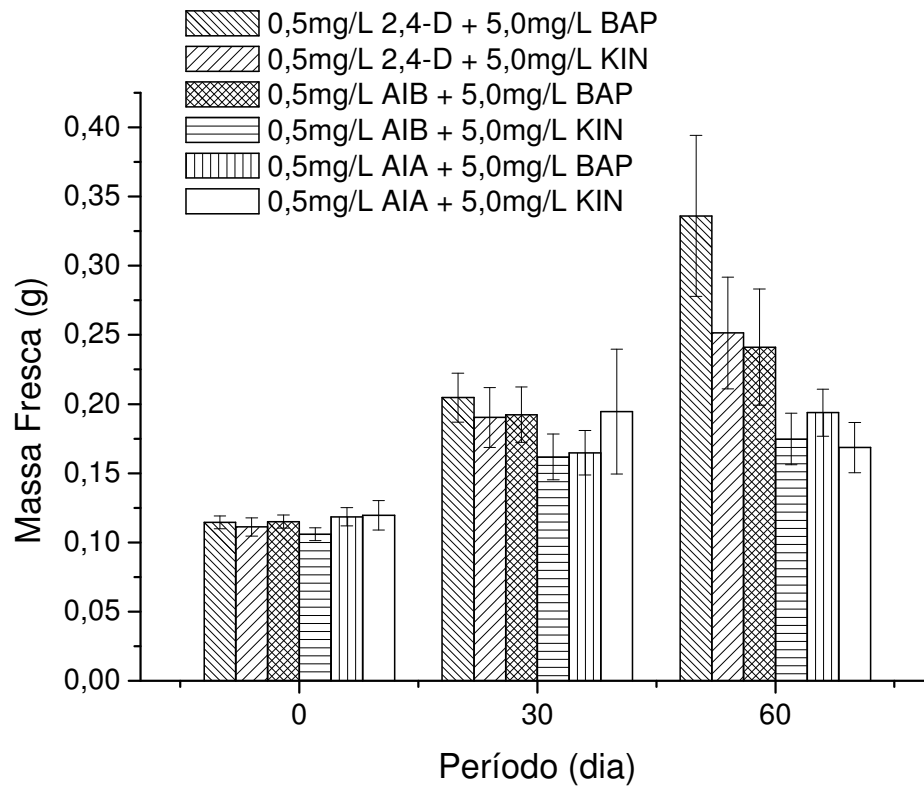


Figura 3: Massa fresca de calos de *Caesalpinia echinata* tratados com diferentes interações entre auxinas e citocininas em diferentes tempos (dias). Barra = erro padrão.

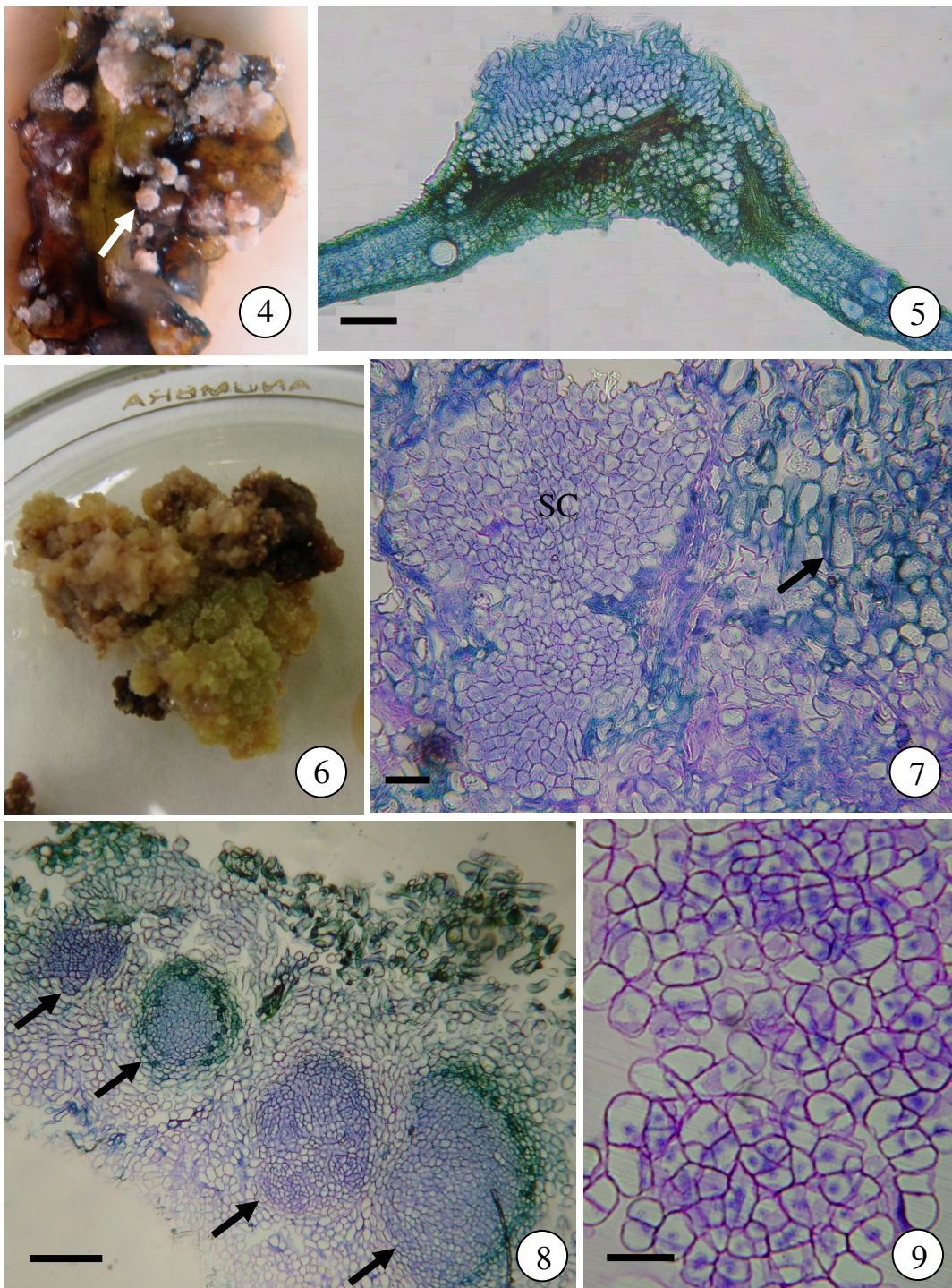


Figura 4 – 9: Aspectos morfológicos e histológicos da calogênese de *C. echinata in vitro*. 4. Início da formação de calos (seta) na folha aos 30 dias. 5. Secção transversal da lâmina foliar mostrando formação do calo aos 30 dias. 6. Calo após 60 dias de inoculação. 7 – 9: Secções transversais de calos após 60 dias de inoculação. 7. Setor compacto (SC) e células alongadas (seta) com compostos fenólicos. 8. Meristemóides (setas). Notar células com acúmulo de fenóis (coloração esverdeada). 9. Detalhe de células em divisão.