

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

**Controle genético e histogênese da regeneração de progênies de  
Eucalyptus grandis in vitro.**

**Carlos David Vera Bravo**

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

**Piracicaba  
2005**

**Carlos David Vera Bravo**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Controle genético e histogênese da regeneração de progênies de *Eucalyptus grandis in vitro*.**

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

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

**Piracicaba**  
**2005**

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

Vera Bravo, Carlos David

Controle genético e histogênese na regeneração de progênies de *Eucalyptus grandis in vitro* / Carlos David Vera Bravo. - - Piracicaba, 2005.  
80 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.  
Bibliografia.

1. Controle genético 2. Eucalipto 3. Herdabilidade 4. Histologia vegetal 5. Organogênese  
6. Regeneração "in vitro" I. Título

CDD634.9734

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

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela sua graça.

Ao Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves pela orientação e amizade compartilhada durante a execução deste trabalho.

À minha esposa Liliana e filhos Mateo, Luz e Benjamin.

Ao Instituto de Tecnologia Agropecuária (INTA) e companheiros de trabalho pelo fornecimento da verba e apoio para me estudar.

Ao Departamento de Ciências Florestais, pela estrutura fornecida para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Marcílio de Almeida e sua equipe (LCB-ESALQ/USP): Cristina e Cássia, pela orientação e ajuda no trabalho de histologia e captura das imagens.

Aos professores Carlos Tadeu dos Santos Dias, e Roland Vencovski pelas ajudas na análise estatística.

Aos amigos e companheiros de Laboratório Diva, Juliana, Wirifran e Beto, pela ajuda e companheirismo durante o desenvolvimento do trabalho.

À turma internacional do departamento Roger, Victor, Ruben, Gisele e suas famílias pela ajuda e amizade compartilhada.

A Jéferson do laboratório de LMQ e colegas da sala da Pós-graduação pela ajuda prestada.

**Meus mais sinceros agradecimentos.**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	6
LISTA DE TABELAS .....	11
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT .....	14
RESUMEN .....	15
1 INTRODUÇÃO .....	16
2 DESENVOLVIMENTO .....	17
2.1 Considerações gerais.....	17
2.2 Regeneração <i>in vitro</i> .....	18
2.3 Organogênese.....	19
2.4 Embriogênese somática .....	21
2.5 Variabilidade genética entre progênies.....	24
2.6 Histologia .....	25
2.7 MATERIAL E MÉTODOS .....	26
2.7.1 Fonte do material vegetal .....	26
2.7.2 Preparo do material e cultura <i>in vitro</i> .....	27
2.7.3 Primeiro experimento .....	29
2.7.4 Delineamento experimental.....	29
2.7.5 Análise estatística .....	30
2.7.6 Análise Histológica .....	30

2.7.7 Segundo experimento .....	31
2.7.8 Herdabilidade .....	32
2.8 RESULTADOS .....	34
2.8.1 Germinação das sementes.....	34
2.8.2 Regeneração .....	34
2.8.3 Regeneração a partir de cotilédones.....	40
2.8.4 Regeneração dos segmentos distais dos hipocótilos .....	43
2.8.5 Regeneração dos segmentos proximais dos hipocótilos.....	48
2.8.6 Células ou tecidos envolvidos na regeneração .....	52
2.8.7 Histologia da regeneração dos cotilédones.....	53
2.8.8 Histologia da regeneração dos hipocótilos .....	55
2.8.9 Caracterização histológica dos meristemas caulinares .....	58
2.8.10 Estudos dos meios de cultura na regeneração .....	59
2.8.11 Avaliação da capacidade de regeneração das progênies .....	61
2.9 DISCUSSÃO .....	63
3 CONCLUSÕES .....	68
REFERÊNCIAS.....	69

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa da Austrália mostrando em vermelho a região de Atherton no Estado de Queensland, origem da população base de *Eucalyptus grandis*. (usado com permissão: do Geoscience Austrália) .....26
- Figura 2 - Fotografia aérea da Estação Experimental Anhembi, em círculo o talhão onde se encontram as árvores matrizes fornecedoras das sementes de *Eucalyptus grandis*. Escala 1:5000 .....27
- Figura 3 – Explantes primários inoculados *in vitro* obtidos de plântulas de *Eucalyptus grandis* germinadas *in vitro* com 20 dias de idade. (A) cotilédones. (B) segmentos dos hipocótilos das regiões distais e (C) segmentos dos hipocótilos das regiões proximais à raiz. Barras = 1,0 cm .....28
- Figura 4 – Regeneração de *Eucalyptus grandis*, 4 semanas após inoculação *in vitro*, (A) cotilédones e (B) e segmentos dos hipocótilos regenerando. Barras = 1,0 cm.....35
- Figura 5 - Influência dos 3 níveis de ANA testados com os 3 níveis de BAP na regeneração de brotos de *Eucalyptus grandis in vitro* mostrando as interações com os explantes: cotilédones (Cot); segmentos dos hipocótilos distais (HD) e proximais (HP).....36
- Figura 6 - Brotos regenerados *in vitro* de cotilédones de *Eucalyptus grandis*: (A) calo organogênico no extremo do corte (organogênese indireta), 8 semanas após inoculação; (B) organogênese em toda superfície do cotilédone, (organogênese direta) 8 semanas após inoculação. Barras = 1,0 mm .....37
- Figura 7 - Oxidação dos explantes primários que foram descartados ao longo do período de avaliação da regeneração *in vitro* de *Eucalyptus grandis* nos diferentes meios testados. C, cotilédones; HD, segmentos distais dos

- hipocótilos e HP, segmentos proximais dos hipocótilos. As barras são os intervalos de confiança para a média a 95% de confiança .....39
- Figura 8 - Brotos de *Eucalyptus grandis* a partir de (A) cotilédones e (B) e segmentos dos hipocótilos cultivados *in vitro*, 10 semanas após inoculação. Barra = 1 cm .....40
- Figura 9 - Médias em porcentagem de regeneração de brotos *in vitro* a partir dos cotilédones, de sete progênies de *Eucalyptus grandis* nos diferentes meios de cultura. As barras são os intervalos de confiança para a média ao nível de 95%. Letras iguais (dados transformados) não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey-Kramer .....42
- Figura 10 – Perfis da regeneração *in vitro* dos cotilédones de *Eucalyptus grandis*, segundo os reguladores de crescimento ANA e BAP em  $\text{mgL}^{-1}$  .....43
- Figura 11 - Organogênese direta a partir de segmentos de hipocótilos de *Eucalyptus grandis* cultivados *in vitro*, (A) gemas adventícias (seta escura) por organogênese direta a partir das células parenquimáticas do córtex. Barra = 25  $\mu\text{m}$ . (B) aproximação da região de transição (seta) entre o córtex e os brotos neoformados. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .....44
- Figura 12 - Organogênese a partir de hipocótilos. (A) hipocótilo mostrando os engrossamentos nos extremos e regeneração num dos extremos. Barra = 1 cm. (B) corte transversal do engrossamento constituída de células parenquimáticas (p) e grupos de células coradas intensamente com azul de toluidina que darão origem às gemas adventícias. Barra = 100 $\mu\text{m}$ . (C) corte transversal do engrossamento apresentando múltiplas gemas (setas claras) com gemas axilares (setas escuras). Barra = 50 $\mu\text{m}$ . (D) vista geral do engrossamento do extremo do hipocótilo com os brotos originados na estrutura. Barra = 1 mm.....45



- Figura 13 - Médias em porcentagem de regeneração de brotos *in vitro* a partir dos segmentos distais dos hipocótilos, de sete progênies de *Eucalyptus grandis* nos diferentes meios de cultura. As barras são os intervalos de confiança para a média ao nível de 95%. Letras iguais (dados transformados) não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey-Kramer .....46
- Figura 14 – Perfis médio e perfil médio geral da regeneração *in vitro* dos segmentos distais dos hipocótilos de *Eucalyptus grandis*, segundo os reguladores de crescimento ANA e BAP em mgL<sup>-1</sup> .....47
- Figura 15 - Médias em porcentagem de regeneração de brotos *in vitro* a partir dos segmentos proximais dos hipocótilos, de sete progênies de *Eucalyptus grandis* nos diferentes meios de cultura. As barras são os intervalos de confiança para a média ao nível de 95%. Letras iguais (dados transformados) não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey-Kramer .....49
- Figura 16 - Perfis médio e perfil médio geral da regeneração *in vitro* dos segmentos proximais dos hipocótilos de *Eucalyptus grandis*, segundo os reguladores de crescimento ANA e BAP em mgL<sup>-1</sup> .....50
- Figura 17- Regeneração dos hipocótilos de *Eucalyptus grandis*, (A) corte transversal de um extremo do segmento apresentando meristemóides (m). Barra = 100 μm (B) meristemóides desenvolvidos (setas). Barra = 25 μm (C) células parenquimáticas do córtex colapsadas (área delimitada e indicada pela seta). Barra= 100 μm (D) feixes vasculares do hipocótilo original, dividindo-se em direção dos brotos neoformados. Barra = 10 μm .....52
- Figura 18 – Regeneração dos cotilédones de *Eucalyptus grandis* (A) direta a partir do pecíolo cotiledonar, as células parenquimáticas do córtex se diferenciam originando meristemóides (setas). Barra = 200 μm. (B) brotos regenerados diretamente a partir dos pecíolos cotiledonares. Barra

= 1 mm. (C) calo da folha cotiledonar diferenciando meristemóides a diferentes profundidades do calo, seta mostrando o acúmulo de fenóis. Barra = 200  $\mu\text{m}$ . (D) gemas caulinares na superfície de calos dos cotilédones, com múltiplas gemas. Barra = 50  $\mu\text{m}$ . (E) calo não organogênico, seta mostrando o acúmulo de fenóis. Barra = 100  $\mu\text{m}$  .....54

Figura 19 – Cortes transversais dos brotos neoformados de *Eucalyptus grandis* que regeneraram órgãos. (A) broto caulinar na superfície do pecíolo cotiledonar. Barra = 50  $\mu\text{m}$  e (B) mostrando a conexão vascular com o tecido original. Barra = 100  $\mu\text{m}$  .....55

Figura 20 – Organogênese secundária em (A) e (B) grupos de células subepidérmicas (setas) que originam os órgãos secundários a partir dos brotos gerados pelos explantes primários de *Eucalyptus grandis*. Barras: 100  $\mu\text{m}$  .....56

Figura 21 - Vista geral dos engrossamentos nos extremos dos segmentos dos hipocótilos de *Eucalyptus grandis* com 6 semanas de idade, (A) calo não organogênico e (B) estrutura organogênica, Barras = 25  $\mu\text{m}$  .....57

Figura 22 - Seções transversais de meristemas apicais caulinares de *Eucalyptus grandis*. (A) meristema organogênico proveniente de hipocótilo cultivado *in vitro*. B) meristema caulinar proveniente de uma plântula de semente germinada *in vitro*. (C) formação de uma gema axilar de um broto organogênico. (D) células meristemáticas do ápice neoformado apresentando (setas) os planos da divisão celular. Barras = 20  $\mu\text{m}$ .....58

Figura 23 - Ajuste da curva de regressão quadrática com ANA fixo, dos segmentos distais dos hipocótilos de 20 dias de idade de *Eucalyptus grandis*, depois de 14 semanas de cultivado *in vitro*. \* Parâmetros significativos ao 5% de significância .....59

- Figura 24 - Ajuste da curva da regressão quadrática dos segmentos proximais dos hipocótilos, após 14 semanas de cultivo *in vitro* de *Eucalyptus grandis*.<sup>\*</sup>  
Parâmetros significativos ao 5% de significância.....60
- Figura 25 - Regeneração *in vitro* a partir dos segmentos distais dos hipocótilos de plântulas de 10 progênies de *Eucalyptus grandis*. Colunas representam médias de regeneração e as barras intervalos de confiança ao nível de 95%.....62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Combinações de reguladores de crescimento adicionadas ao meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995).....	29
Tabela 2 - Esquema de análise da variância correspondente a uma seleção entre as médias das parcelas .....	32
Tabela 3 - Esquema da análise da variância da regeneração a partir de plântulas de 20 dias de idade de <i>Eucalyptus grandis</i> , onde são testados 3 tipos de explantes (cotilédones, segmentos distais e proximais dos hipocótilos e 9 meios de cultura (combinações de ANA e BAP em mgL <sup>-1</sup> ).....	35
Tabela 4 - Influência dos reguladores de crescimento no meio JADS (CORREIA et al., 1995) sobre as médias dos dados transformados* de regeneração dos três tipos de explantes, 14 semanas após inoculação <i>in vitro</i> . Os explantes provêm de plântulas com 20 dias de idade, de sete progênies de <i>Eucalyptus grandis</i> .....	38
Tabela 5 – Oxidação dos explantes primários em médias dos dados transformados.* 14 semanas após inoculação <i>in vitro</i> . Os explantes provêm de plântulas com 20 dias de idade, de sete progênies de <i>Eucalyptus grandis</i> .....	40
Tabela 6 - Resultados da análise da variância correspondente a uma seleção entre as médias das parcelas, da regeneração <i>in vitro</i> de dez progênies de <i>Eucalyptus grandis</i> , após 14 semanas da inoculação.....	61
Tabela 7 - Medias das duas observações de cada progênie por bloco de regeneração <i>in vitro</i> de dez progênies de <i>Eucalyptus grandis</i> utilizando o segmento distal dos hipocótilos como explante primário .....	61

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANA - Ácido naftalenoacético

ANVA - Análise de Variância

BAP - Benzilaminopurina

ESALQ - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

MLG - Modelos Lineares Generalizados

IPEF - Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais

ire1 – “increased organ regeneration1”

JADS - Meio de Cultura

ml - mililitro

mgL<sup>-1</sup> - miligramas por litro

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

RNP - Relação Núcleo Plasma

PAR - Radiação Fotossinteticamente Ativa

PPO - Polifenol-oxidase

TDZ - thidiazuron

USP - Universidade de São Paulo

µm - micrometros

## RESUMO

### **Controle genético e histogênese da regeneração de progênies de *eucalyptus grandis* *in vitro*.**

Com o objetivo de conhecer meios, explantes, tecidos envolvidos e controle genético da regeneração *in vitro* a partir de plântulas de *Eucalyptus grandis*, dez progênies de polinização aberta da população base, origem Atherton localizada em Anhembi, estado de São Paulo foram utilizadas. Sementes de sete progênies foram germinadas *in vitro*. Após vinte dias de cultivo, cotilédones, segmentos proximais e distais dos hipocótilos foram inoculados em nove meios de cultura usando o meio basal de JADS em combinação com dois reguladores de crescimento (ANA e BAP). Após 14 semanas de cultivo, foram feitas avaliações da regeneração e histologia. Células do córtex estavam envolvidos na regeneração dos hipocótilos e as células subepidérmicas originaram calos e estes deram origem a brotos nos cotilédones. Todos os brotos formados tiveram conexão com o sistema vascular do tecido original. Foi verificado que o melhor tratamento, onde 41% dos hipocótilos distais regeneraram, na combinação de ANA e BAP 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Posteriormente, os segmentos distais dos hipocótilos das dez progênies foram inoculados naquele meio, houve diferenças significativas de regeneração entre as progênies ( $P < 0,0001$ ) com extremos de regeneração de 11% a 60% e com uma média de 37%. A herdabilidade quanto ao caráter foi alta ( $h_m^2 = 0,94$ ), indicando que houve um forte controle genético na regeneração *in vitro* dentro da população. Houve também alta variabilidade dentro da amostra estudada assim como um forte efeito materno sobre a regeneração.

Palavras-chave: Regeneração *in vitro*; Organogênese; Controle genético; Histologia; *Eucalyptus grandis*; Herdabilidade

## ABSTRACT

### **Genetic control and histological analysis of *in vitro* regeneration of *Eucalyptus grandis* progenies.**

Aiming at better knowledge on tissue culture media, axplants, tissues involved and genetic control of *in vitro* regeneration of *Eucalyptus grandis* from seedlings, seeds from ten open pollinated progenies from the basic population, origin Atherton, located in Anhembi, São Paulo State (BR) were used. Initially, seeds from seven progenies were germinated *in vitro*. Twenty days after culture, cotyledons and, distal and proximal hypocotyls segments were inoculated in culture media using JADS basic medium with various NAA + BAP combinations. After 14 weeks of culture, evaluations bud induction, regeneration, and histological analysis were done. Cortex cells were involved in hypocotyls direct regeneration and cotyledon epidermic cells gave rise to callus which in turn produced shoots. All shoots developed had connection to the original vascular system. It was verified that NAA + BAP at 0,5 mgL<sup>-1</sup> concentration each was the best treatment, where 41% of the distal hypocotyls regenerated. Distal hypocotyl segments from of seedlings of ten progenies were inoculated showing significant differences regeneration among progenies. Regeneration varied from 11% to 60% with a mean of 37%; the heritability in relation to the character was ( $h_m^2 = 0,94$ ), indicating that there was a strong genetic control of the *in vitro* regeneration within the population. Also, there was a high variability within the samples studied as well as a strong maternal effect on the regeneration.

Keywords: *in vitro* Regeneration; Organogenesis; Genetic control; Histology; *Eucalyptus grandis*; Heritability

## RESUMEN

### **Control genético e histología de la regeneración *in vitro* de progenies de *eucalyptus grandis*.**

Con el objetivo de conocer medios de cultivo, explantes, tejidos y control genético de la regeneración *in vitro* a partir de plantines de *Eucalyptus grandis*, diez progenies de polinización abierta de una población base, de origen Atherton localizada en Anhembi, en el estado de San Pablo fueron utilizadas. Semillas de siete progenies fueron germinadas *in vitro*. Después de 20 días de cultivo, cotiledones, y segmentos proximales y distales de los hipocótilos fueron inoculados en nueve medios de cultivo usando el medio basal de JADS en combinación con dos reguladores de crecimiento (ANA y BAP). Después de 14 semanas de cultivo, se hicieron evaluaciones de organogénesis e histología. Células del cortex participan en la regeneración de los hipocótilos y células subepidérmicas originan callos y estos dan origen a vástagos. Todos los vástagos formados tuvieron conexión con el sistema vascular del tejido original. Fue verificado que el mejor tratamiento, donde 41% de los de los hipocótilos distales regeneraron en la combinación de ANA y BAP  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ . Posteriormente, los segmentos distales de las diez progenies fueron inoculados en aquel medio, hubo diferencias significativas de regeneración entre las progenies ( $p < 0,0001$ ) con extremos de regeneración de 11% a 60% y con una media de 37%. La heredabilidad en relación a este carácter fue alta ( $h_m^2 = 0,94$ ), indicando que hubo un fuerte control genético de la regeneración *in vitro* dentro de esta población. Hubo también alta variabilidad dentro de la muestra estudiada así como un fuerte efecto materno sobre la regeneración *in vitro*.

Palabras claves: Regeneración *in vitro*; Organogénesis; Control genético; Histología; *Eucalyptus grandis*; Heredabilidad



## 1 INTRODUÇÃO

O sucesso na exploração industrial dos eucaliptos no Brasil foi baseado, desde sua introdução, nos programas de melhoramento, até o desenvolvimento da propagação clonal durante as últimas décadas (CAMPINHOS; IKEMORI, 1983). Neste contexto, a estimativa de parâmetros genéticos, sua comparação entre procedências, progênes e métodos de propagação e uso na predição de ganhos genéticos é importante nos sistemas de produção (KAGEYAMA; KIKUTI, 1981, OSÓRIO et al., 2001).

Atualmente, os programas de melhoramento não dispõem de sistemas eficientes de regeneração de progênes de *Eucalyptus grandis in vitro*. Tão pouco, estudos histológicos sobre os tecidos envolvidos na regeneração *in vitro*, nem como varia esta característica dentro de uma população.

A regeneração de progênes a partir de tecidos juvenis, como cotilédones e hipocótilos, pode constituir uma alternativa para regenerar progênes, testar clones a partir destas progênes, comparar caracteres associados *in vitro* e *in vivo* e ampliar a base genética visando fornecer variabilidade para os programas de melhoramento genético. Vários trabalhos descrevem métodos de regeneração de eucaliptos por organogênese (BANDYOPADHYAY et al., 1999; BARRUETO-CID et al., 1999; GONZÁLEZ, 2002, SARTORETTO et al., 2002; SHARMA; RAMAMURTHY, 2000; SUBBAIAH; MINOCHA, 1990; WARRAG et al., 1991) e embriogênese somática (BANDYOPADHYAY et al., 2000; HERVÉ et al., 2001; PINTO et al., 2002; WATT et al., 1991) para espécies e híbridos comerciais de eucaliptos.

Têm sido verificadas diferenças entre progênes em espécies florestais quanto à capacidade de regeneração *in vitro* (LAINÉ; DAVID, 1994; TANG et al., 2001). Estas diferenças significativas sugerem a existência fatores genéticos que controlam este caráter (HENRY; VAIN; BUYSER, 1994) estando associado aos processos de desenvolvimento *in vitro* (CHRISTIANSON; WARNICK, 1988).

Parâmetros genéticos são determinados em *Eucalyptus grandis* visando a produtividade e características da madeira (KAGEYAMA; VENCOVSKY, 1983; OSÓRIO; WHITE; HUBER, 2001; MORAES, 1987). Nesta espécie, a regeneração *in vitro* como caráter herdável não foi estudado.

Ruaud et al., (1999), estudando a habilidade de enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus*, encontraram uma diminuição do enraizamento a medida que foram multiplicado os brotos, os autores explicam este sucesso como consequência do esgotamento dos explantes originais de onde se extraíam os brotos para os testes ao longo do tempo, no entanto devido à diferença da variação genética aditiva dentro e entre populações há um potencial para o melhoramento deste caráter nesta espécie.

A organogênese e/ou a embriogênese somática podem ser alternativas de regeneração ao sistema convencional de micropropagação para o estabelecimento de plantações de genótipos superiores.

Os objetivos do presente trabalho foram: desenvolver um sistema de regeneração *in vitro* de progênies de polinização aberta de *Eucalyptus grandis* (efeitos das concentrações dos reguladores foram estudados sobre a taxa de regeneração), estudar o grau de regeneração dos explantes, avaliar a influência genética na regeneração *in vitro* e determinar histologicamente as células ou tecidos envolvidos no processo da regeneração.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Considerações gerais**

Entre as espécies florestais, o *Eucalyptus* (Myrtaceae) é amplamente cultivado em sistemas de produção de rotações curtas. Algumas das 600 espécies são comercialmente importantes para madeira, energia, óleos essenciais e polpa (HERVÉ et al., 2001), em função de sua diversidade, adaptabilidade, alta produtividade e características físico-mecânicas que permitem múltiplos usos.

As plantações florestais no Brasil ocupam cerca de 6,4 milhões de hectares, dos quais, 3 milhões de hectares estão ocupados com *Eucalyptus* (GONÇALVES; STAPE, 2002).

Nos programas de melhoramento, o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* tem grande importância no Brasil, pelas propriedades superiores da madeira, enraizamento, e resistência a doenças. Por esta razão, este híbrido ocupa a maior parte

do eucalipto plantado no Brasil e utilizado na indústria de papel e celulose, que representa 25% do mercado mundial desse setor (MENDES-DA GLORIA, 2004).

O aumento de produtividade através de programas de melhoramento, onde a propagação vegetativa tem contribuído otimizando ganhos genéticos e clonando genótipos elite, incrementando o crescimento anual até duas vezes quando comparado com os de sementes (TIBOK et al., 1995).

## **2.2 Regeneração *in vitro***

A regeneração via cultura de tecidos vegetais basicamente está influenciada pelo genótipo, meios de cultura, tipos de explantes e as condições de cultura (HENRY; VAIN; BUYSER, 1994; MROGINSKI; KARTHA, 19984). O tipo de explante, bem como a definição de seu estágio de desenvolvimento é um dos fatores que determina, a capacidade de resposta *in vitro*. O material doador de explantes fornecerá células competentes, responsivas aos estímulos químicos, bioquímicos e físicos, tomando uma rota embriogênica de desenvolvimento. Malgorzata (2004) fez um levantamento de 124 publicações recentes e encontrou que mais de 35% dos explantes utilizados na embriogênese somática são embriões zigóticos imaturos, seguido por plântulas, folhas e inflorescências.

Dentre os fatores envolvidos na regeneração *in vitro*, a nutrição mineral tem um papel importante na regulação morfogênética (HIGASHI, 1996; RAMAGE; WILLIAMS, 2002) por ser o meio de cultura o componente mais abundante dos fatores. A disponibilidade, absorção, transporte e metabolismo dos diferentes minerais participam na formação de meristemas e órgãos, e no subsequente crescimento. O balanço de nitrogênio, fósforo e cálcio são essenciais tanto para a morfogênese como para o crescimento, e os íons como potássio, magnésio e enxofre parecem cumprir roles de suporte (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

A organogênese adventícia envolve a desdiferenciação do explante, formação de calos e a indução de novos órgãos a partir destes calos. A adição de reguladores de crescimento vegetais aos meios de cultura não só controla este processo mais também é requerido para que a organogênese ocorra (CHRISTIANSON; WARNICK, 1988). O nível endógeno de reguladores de crescimento é considerado um fator crucial que

influencia o potencial embriogênico (MALGORZATA, 2004) e organogênico (ZAFFARI et al., 2000) do explante.

O desenvolvimento envolve um incremento em tamanho como resultado da divisão e expansão celular, diferenciação, maturação de células e de tecidos (NEWBIGIN et al., 1995).

### 2.3 Organogênese

Skoog e Miller (1957) estabeleceram o princípio do controle hormonal na formação de órgãos em células de medula de tabaco cultivadas *in vitro* e obtiveram a diferenciação de órgãos (gemas e raízes) pela ação quantitativa de auxinas e citocininas. Tal diferenciação é regulada pelas concentrações relativas dos dois tipos de reguladores de crescimento no meio de cultura, onde os tecidos usualmente requerem um suprimento exógeno de auxinas e citocininas para alcançarem níveis de desenvolvimento adequados (DROUAL et al., 1998). Quando há predomínio de auxinas sobre as citocininas, há formação de raízes, relações baixas, favorecem a formação de gemas que diferenciam a parte aérea da planta, em relações proporcionais, há formação de calos (SKOOG; MILLER, 1957), Salisbury et al. (1991) acrescentam que com predomínio de auxinas há formação de calos e raízes.

A organogênese *in vitro* geralmente é ativada por uma adequada concentração de auxinas e citocininas, que levam a uma diferenciação direta de meristemas ou indiretamente de calos formados previamente (AZMI et al., 1997).

Portanto, este conceito de regulação hormonal tem sido aplicado em vários trabalhos de organogênese em *Eucalyptus* a partir de folhas de clones micropropagados, segmentos nodais, embriões ou plântulas (BANDYOPADHYAY; HAMILL, 2000; BARRUETO-CID et al., 1999; LAINÉ; DAVID, 1994, LAKSHMI; SHOBA, 1985; MURALIDHARAN; MACARENHAS, 1987; NUGENT, et al., 2001; PINTO et al., 2002; SUBBIAH e MINOCHA, 1990).

Curuk et al. (2002), definem a organogênese como um processo pelo qual brotações novas são obtidas *in vitro*, por divisão celular e diferenciação, que eventualmente conduz a formação de um novo meristema apical com a subsequente alongação.

Christianson e Warnick (1988), descreveram a organogênese em termos de desenvolvimento onde durante a primeira fase as células se desdiferenciam e dividem-se formando calos. Durante esta fase, ocorre aquisição de competência para na fase seguinte (indução) responder a sinais hormonais especificados pela composição hormonal do meio. Na terceira fase, os tecidos determinados formam meristemas funcionais e desenvolvem brotações ou raízes dependendo dos reguladores de crescimento exógenos, particularmente relações de auxinas/citocininas. O fenômeno da regeneração também depende do grau de diferenciação das células do explante, porque quanto mais intensa a diferenciação mais determinada é o explante (PERES, 2002). Indução é um processo pelo qual um sinal de desenvolvimento age em células competentes para alterar o seu destino de desenvolvimento (MCDANIEL, 1992). O resultado da indução é a formação de uma população de células determinadas cujo destino está agora fixado ao longo de um caminho de desenvolvimento particular (CHRISTIANSON; WARNICK, 1988).

Cary et al. (2001), cultivando raízes de mutantes e plantas selvagens de *Arabidopsis thaliana* encontraram que os mutantes diferem das selvagens por ter incrementado a capacidade de regenerar raízes, calos verdes ou brotos caulinares a qualquer concentração de citocininas. A especificação do tipo de órgão governado pelas concentrações de auxinas/citocininas não acontece nos mutantes, sugerindo que o tipo de órgão não é especificado durante a indução. Isto sugere que a mutação afeta os processos que precedem à especificação de órgãos durante a aquisição da competência. Conseqüentemente, o gene *IRE* expressa-se antes da especificação de órgãos e esta resposta está ligada a um incremento na sensibilidade das citocininas.

Hewelt et al. (2000), estudando a expressão ectópica do gene *Knotted1* e o efeito das citocininas sobre a morfologia da planta, sugerem que o gene *kn1* e as citocininas estão ligadas funcionalmente. Mostraram que os tecidos das folhas de tabaco com o gene *kn1* adquirem a capacidade autotrófica de biossíntese de citocininas para crescer e acumular altos níveis de citocininas, comparadas com as não transformadas sob as mesmas condições de cultura. Este gene estaria relacionado com os genes de metabolismo hormonal.

Adicionalmente, para que um tecido se diferencie em um determinado órgão, faz-se necessário que ele possua a capacidade de expressão dos genes “mestres” que coordenam a expressão dos vários genes requeridos durante a organogênese. Dessa forma, explantes que falham em formar um determinado órgão *in vitro* em função da determinação, podem ter perdido a capacidade de expressão de genes “mestres” durante um processo intenso de diferenciação pelo qual passou (PERES, 2002).

Tipos de explantes têm sido testados e são em geral tecidos jovens (provenientes de plântulas) como embriões zigóticos, partes florais, inflorescências imaturas, hipocótilos, cotilédones, folhas jovens, entrenós, nós, folhas de brotos caulinares micropropagados (BANDYOPADHYAY et al., 1999; GONZÁLEZ, 2002; SARTORETTO et al., 2002; SUBBAIAH; MINOCHA, 1990; WARRAG et al., 1991).

Além do tipo de explante, a idade do mesmo também exerce grande influência na resposta à indução de organogênese. Em *Eucalyptus globulus*, a utilização de explantes de plântulas com 8 a 15 dias de idade germinadas *in vitro*, com cotilédones bem desenvolvidos, hipocótilo alongado, sem folhas desenvolvidas foi o único estágio competente para regeneração de brotos via organogênese a partir de hipocótilos. Quando os explantes foram obtidos a partir de plântulas mais velhas, têm-se mostrado menos responsivos à produção de gemas adventícias (AZMI et al., 1997).

A maioria dos trabalhos com regeneração *in vitro* tanto por via organogênica ou embriogênica em eucaliptos utilizam meios nutritivos diferentes como B<sub>5</sub>, WPM (MURALIDHAN; MASCARENHAS, 1987), MS e MS modificado (GONZÁLEZ, 2002; BARRUETO-CID et al., 1999; SARTORETTO et al., 2002; SUBBAIAH; MINOCHA, 1990;) e reguladores de crescimento como 2,4-D, ANA, BAP, thidiazuron (TDZ).

Diferenças quanto à regeneração foram observadas entre clones e entre genótipos regenerados a partir plântulas de *Eucalyptus grandis* (LAINÉ; DAVID, 1994) sugerindo que a habilidade para regenerar é genótipo-dependente.

## **2.4 Embriogênese somática**

Embriogênese somática, adventícia ou assexual, ou seja, processo pelo qual, células haplóides ou somáticas diplóides desenvolveram-se em plantas por meio de estágios embriológicos característicos sem a fusão de gametas. O embrião somático é

uma estrutura bipolar, completamente fechada em uma delgada, estratificada, translúcida cobertura seminal, os quais não mantêm conexão física vascular com o explante que lhe deu origem (BANDYOPADHYAY; HAMILL, 2000; RAMAGE; WILLIAMS, 2002; VON ARNOLD et al., 2002; WATT et al., 1991).

Desde que Steward et al. (1958) descreveu este fenômeno com cenoura, a embriogênese somática nesta espécie é utilizada como um sistema experimental por sua simplicidade e facilidade para obter um grande número de embriões para experimentos genéticos e bioquímicos (SUNG et al., 1988).

A embriogênese somática é utilizada para regenerar plantas a partir de sistemas de cultivo de células, além disso, se usa como modelo para determinar os fatores que regulam os eventos morfogênicos que ocorrem na embriogênese somática (DODEMAN et al., 1997; LIU et al., 1993).

Os embriões somáticos são induzidos a partir de cultura de tecidos ou células de calo por manipulação simples das condições de cultura *in vitro*. Geralmente envolve processos de: estabelecimento de calos a partir de explantes provenientes da planta mãe; seleção de linhagens embriogênicas; remoção de auxinas do meio de cultura (ZIMMERMAN, 1993).

Sung et al., (1988) estudaram a influência do 2,4-D na embriogênese e dividiram o processo conceitualmente em três fases: indução de divisão celular; indução do potencial embriogênico e expressão do programa embriogênico. Onde, o 2,4-D estimula a divisão celular e induz um potencial embriogênico, uma vez que este potencial é induzido, a expressão do programa embriogênico não requer 2,4-D. Ao contrário, o 2,4-D suprime ou diminui o desenvolvimento dessas células num estado embriogênico similar aos gametas.

O desenvolvimento dos embriões somáticos é muito semelhante aos embriões zigóticos tanto morfológica e temporalmente. Os embriões na primeira fase (globular), geralmente crescem mais que o aglomerado de células que o originou, de 5 a 7 dias após remover a auxina do meio. Em alguns casos, o pequeno suspensor pode ser visto, muitos embriões são visualizados melhor em meio sólido que em meio líquido. Depois de 2 a 3 dias, têm um crescimento isodiamétrico equivalente à fase globular, seguido por uma fase oblonga que vai até um crescimento simétrico bilateral

denominada cordiforme. A transição de globular a cordiforme é facilmente detectável por ter dois cotilédones, alongamento do hipocótilo e início do crescimento radicular passando por uma fase de torpedo até plântula. O processo dura de 17 a 21 dias onde apresenta cotilédones verdes, hipocótilos longos e radículas desenvolvidas com pêlos radiculares (ZIMMERMAN, 1993).

Em *Eucalyptus*, a formação de embriões somáticos ou estruturas parecidas a embriões foram reportados em poucas espécies de interesse comercial como *Eucalyptus citriodora* (MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1987), *Eucalyptus grandis* (WATT *et al.*, 1991; GONZÁLEZ, 2002), *Eucalyptus urophylla* (TIBOK *et al.* 1995), *Eucalyptus nitens* e *Eucalyptus globulus* (BANDYOPADHYAY *et al.*, 1999; NUGENT, *et al.*, 2001) mostrando diferenças quanto à regeneração entre as espécies.

Os embriões zigóticos têm período de dormência, além de ter tegumentos e endosperma que são requeridos para conservação e germinação, respectivamente. Estudos realizados nas fases primárias da embriogênese somática e zigótica ao nível de mecanismos moleculares mostram desenvolvimento similar (DODEMAN *et al.*, 1997).

Calos que apresentam estruturas embriogênicas de *Eucalyptus nitens* são tipicamente brilhantes, brancos e friáveis de forma elíptica a ovóide de 1,0 mm a 1,5 mm de comprimento, quase toda sua morfologia é similar a das sementes (1,5 mm a 2,0 mm). Nesta espécie, a ultraestrutura do embrião somático tem uma forte similaridade às encontradas em sementes. Os embriões somáticos são ligeiramente menores em suas partes, porém similares em sua morfologia geral e em sua organização celular interna (BANDYOPADHYAY e HAMIL, 2000). Em razão disso, os autores supõem que o processo de conversão é normal, no entanto se têm dados variáveis, como Watt *et al.* (1991) em *Eucalyptus grandis* (> 60%); Pinto *et al.*, (2002) em *Eucalyptus globulus* (21%). Nesta última espécie houve malformações e a conversão foi incompleta (NUGENT *et al.*, 2001).



## 2.5 Variabilidade genética entre progênies

Rosado (1999) estudou a genética da eficiência nutricional de famílias de meios-irmãos de *Eucalyptus camaldulensis* e de clones de *Eucalyptus urophylla*. Concluiu que se pode obter ganhos pela aplicação de seleção para eficiência nutricional de P, K, Ca e Mg, tanto para famílias de meios-irmãos como para clones, sendo a eficiência de utilização, o critério mais apropriado nos processos de seleção.

Paula et al. (1998) avaliaram a variabilidade genética entre e dentro de famílias de meios-irmãos de *Eucalyptus camaldulensis* e determinaram parâmetros genéticos para eficiência de utilização de P, K, Ca, e Mg no lenho, na casca e no tronco. Verificaram diferenças genéticas significativas entre as famílias de meios-irmãos quanto às características de utilização dos nutrientes estudados para produção de matéria seca de lenho, casca e tronco; exceção feita à eficiência de utilização de Ca no lenho. Tal fato é mais evidenciado ao se comparar a família de menor eficiência de utilização de Ca no lenho com a de maior eficiência.

Tang e Ouyang (1999) determinaram a influência dos meios de cultura sobre a organogênese de 6 progênies de *Pinus taeda* L. e encontraram 3 famílias que se destacaram quanto à regeneração.

Tang et al. (2001) aplicou um protocolo de regeneração via embriogênese somática de 3 para 27 famílias de *Pinus*, verificando uma ampla variabilidade de regeneração entre 5,4% e 77,2%, indicando que há uma forte influência do genótipo na regeneração entre elas.

## 2.6 Histologia

O meristema apical do caule caracteriza-se por ser a região de crescimento da gema terminal, da qual todos os tecidos primários do caule são derivados. Este meristema, ao contrário do radicular, origina os órgãos laterais de formação exógena, formando os primórdios das folhas e, em muitos casos, os primórdios das gemas laterais ou em botões florais.

Schmidt (1924) apud Cutter (1987) propôs a teoria túnica – corpo na qual o ápice do caule é formado de duas regiões ou zonas. A túnica consiste de uma ou mais camadas periféricas de células nas quais ocorrem divisões predominantemente anticlinais. O corpo está constituído de um núcleo central de células nas quais as divisões ocorrem em todos os planos. Esta teoria é puramente descritiva e não traz implicações em relação ao futuro destino das células.

O meristema apical do caule origina os órgãos laterais e é o local da diferenciação dos tecidos primários. O caule possui três sistemas de tecidos: dérmico, vascular e fundamental. O tecido dérmico ou epiderme se diferencia da camada mais externa da túnica nas angiospermas. Os tecidos vasculares primários diferenciam-se a partir do procâmbio que se desenvolvem das células derivadas do meristema apical e o tecido fundamental diferencia-se do meristema periférico e do meristema em costela (CUTTER, 1987).

## 2.7 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.7.1 Fonte do material vegetal

As sementes utilizadas foram coletadas de árvores matrizes com 23 anos de idade de dez progênies de *Eucalyptus grandis* de polinização aberta. Estas árvores formam parte da população base de origem Atherton QLD/Austrália (Figura 1) e encontram-se na Estação Experimental de Anhembi, no município de Anhembi (SP), Brasil (Figura 2), do departamento de Ciências Florestais, ESALQ, USP.

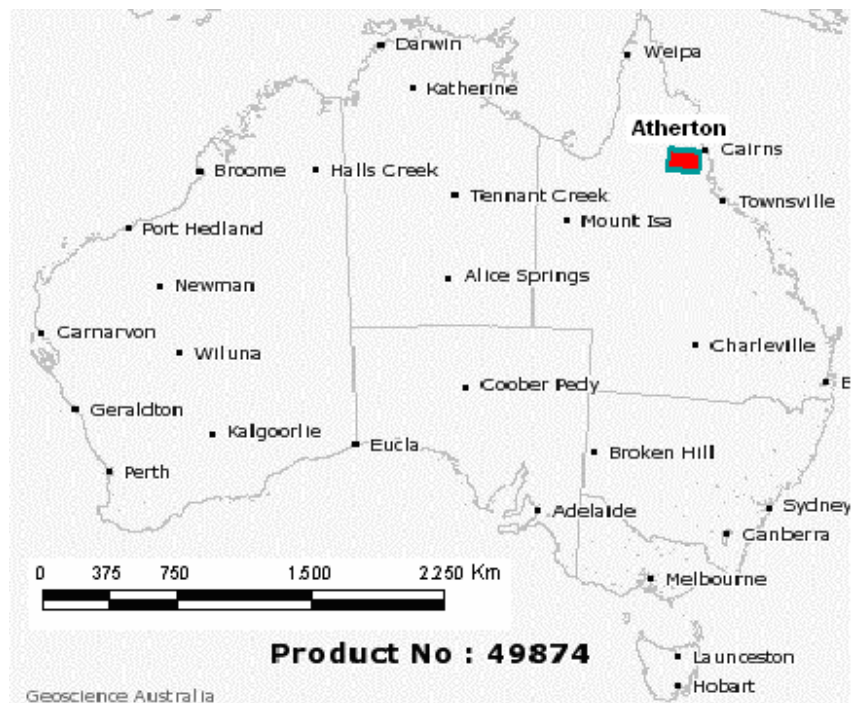


Figura 1 - Mapa da Austrália mostrando em vermelho a região de Atherton no Estado de Queensland, origem da população base de *Eucalyptus grandis*. (usado com permissão: do Geoscience Austrália)

A Figura 2 apresenta uma fotografia aérea da Estação Experimental de Anhembi, com uma aproximação do talhão onde se encontra a população base de *Eucalyptus grandis*.



Figura 2 - Fotografia aérea da Estação Experimental Anhembi, em círculo o talhão onde se encontram as árvores matrizes fornecedoras das sementes de *Eucalyptus grandis*. Escala 1:5000

A Estação Experimental está situada a 22°47' de Latitude Sul e 48°09' de Longitude Oeste, com uma altitude de 500 m, clima Cwa com verões quentes e chuvosos, invernos moderadamente frios e secos e com temperatura média anual de 21 °C e precipitação média anual de 1.350 mm.

### **2.7.2 Preparo do material e cultura *in vitro***

Os frutos das progênes foram coletados em janeiro de 2004. As sementes foram separadas segundo processo corrente do IPEF e mantidas em geladeira a temperatura de 5°C em sacos plásticos vedados. As sementes foram desinfetadas com água sanitária comercial 100% (2-2,5% p/v de NaOCl) com adição de 10 gotas de Tween 20

a cada 30 mL do produto, durante 1 hora e seguido, por seis lavagens com água destilada e esterilizada.

As sementes foram semeadas em frascos com capacidade volumétrica de 220 mL contendo 40 mL de meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) e 0,5% de agar. O pH do meio foi ajustado a 5,8 antes da esterilização em autoclave a 121°C durante 20 min. Os explantes inoculados para regenerar *in vitro* foram mantidos em sala de crescimento durante os primeiros 4 dias no escuro, posteriormente a 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Os explantes utilizados foram cotilédones (Figura 3A), segmentos de hipocótilos proximais (Figura 3B) e distais (Figura 3C) de plântulas germinadas *in vitro* com 20 dias de idade, cultivados em meios de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) com reguladores de crescimento (Tabela 1) para favorecer a regeneração. Nos experimentos preliminares, foram observadas a produção de calos e de organogênese nos explantes e nos diferentes meios de cultura, onde se combinaram concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) e benzilaminopurina (BAP).

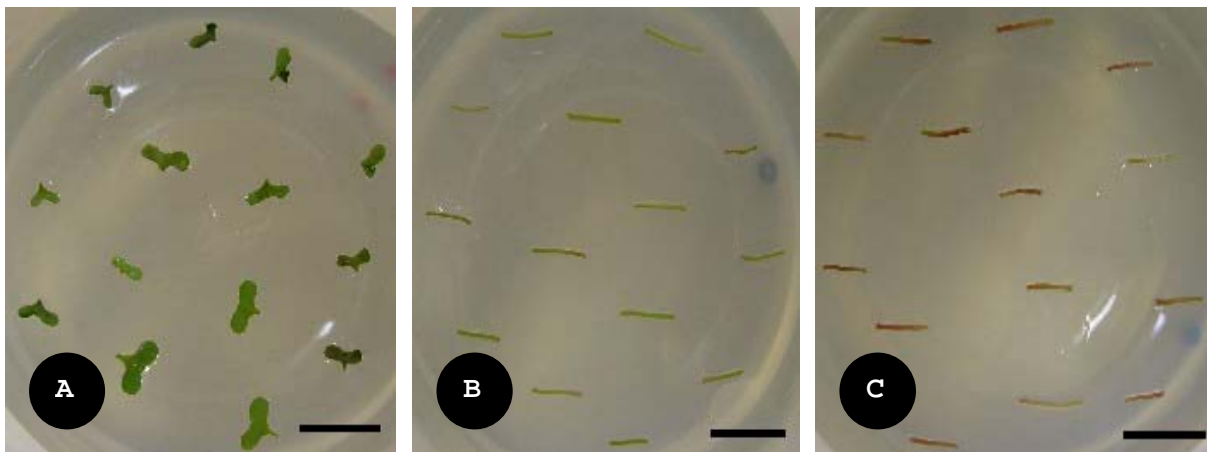


Figura 3 – Explantes primários inoculados *in vitro* obtidos de plântulas de *Eucalyptus grandis* germinadas *in vitro* com 20 dias de idade. (A) cotilédones. (B) segmentos dos hipocótilos das regiões distais e (C) segmentos dos hipocótilos das regiões proximais à raiz. Barras = 1,0 cm

### 2.7.3 Primeiro experimento

O experimento foi instalado com sete progênies selecionadas aleatoriamente visando determinar o melhor meio e o melhor explante. Um cotilédone de cada plântula (dois por progênie por frasco) foi inoculado com a face adaxial em contato com o meio. Os hipocótilos de cada plântula foram cultivados em dois segmentos (proximal e distal em relação à raiz). Foram inoculados 14 explantes em cada frasco.

Estudos histológicos para determinar a origem da morfogênese foram feitos no Laboratório de Morfogênese Vegetal, do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ, USP.

Tabela 1 - Combinações de reguladores de crescimento adicionadas ao meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995)

Ácido naftalenoacético (ANA) mgL <sup>-1</sup>	Benzilaminopurina (BAP) mgL <sup>-1</sup>
0,1	0,5
0,1	1,0
0,1	2,0
0,5	0,5
0,5	1,0
0,5	2,0
1,0	0,5
1,0	1,0
1,0	2,0

### 2.7.4 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi em Blocos Aleatorizados (BA) com 27 tratamentos e 6 repetições no esquema fatorial 9 x 3 (dois fatores: meios x explantes). A unidade experimental foi um frasco de 6,0 cm de diâmetro de 220 mL de volume, com 14 explantes, totalizando 162 unidades experimentais no ensaio. A variável resposta foi a regeneração medida em porcentagem (% de explantes que regeneraram sobre o total de explantes).

### 2.7.5 Análise estatística

O efeito dos meios, explantes e a interação entre eles na regeneração *in vitro* foi examinado através da análise da variância. Os valores descritivos de probabilidade (p) obtidos foram calculados pelo procedimento GLM do Sistema Computacional Estatístico SAS (1999). Devido aos valores de resposta zero, foi somado a constante 0,5 a todos os valores da variável permitindo assim, proceder a análise exploratória. Algumas suposições da análise da variância não foram satisfeitas (não normalidade dos resíduos e heterogeneidade da variância). A melhor transformação  $[(x)^{0.3}]$  para a variável dependente (regeneração) foi encontrada através do método de transformação Box e Cox (1964).

Também foi feita análise da variância da regressão polinomial, com teste para falta de ajuste do esquema da análise de variância das regressões e do teste F para algumas concentrações de ANA e BAP de interes, conforme Banzato e Kronka (1995).

### 2.7.6 Análise Histológica

Os três tipos de explantes (cotilédones, segmentos proximais e distais do hipocótilo) em diferentes fases de diferenciação e os meristemas de plântulas de sementes germinadas *in vitro* foram coletados e fixados em solução (Karnovski, 1965). Depois de fixadas, as amostras foram desidratadas através de uma série alcoólica-etilica (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% v/v) permanecendo 10 min em cada solução. Em seguida, as amostras foram infiltradas em resina glicol metacrilato (Leica Historesin). Os blocos com as amostras obtidas na infiltração foram seccionadas a 5  $\mu$ m de espessura em micrótomo rotativo manual. As secções foram posteriormente coradas com azul de toluidina 0,05% (v/v) em tampão fosfato e ácido cítrico (Sakai, 1973) durante 15 min e montados em resina sintética Entellan (Merck). Posteriormente, as lâminas histológicas foram analisadas e as imagens obtidas em microscópio óptico (Zeis) acoplado a um sistema de captura de imagens com as respectivas escalas na mesma proporção.

### 2.7.7 Segundo experimento

Este experimento foi montado para determinar a capacidade da regeneração de dez progênies de *Eucalyptus grandis* de origem Atherton, sete delas foram utilizadas no primeiro experimento na determinação de um meio de cultura e um explante, para ser utilizados neste experimento. Para isto, fizeram-se meios de cultura com o meio basal de JADS (CORREIA et al., 1995) sem reguladores de crescimento, cada frasco teve 40 ml de meio e inocularam-se 20 sementes por frasco e 16 frascos por progênie, as sementes foram desinfetadas segundo o experimento anterior. Das plântulas de 20 dias de idade, foram obtidos os segmentos distais dos hipocótilos (uma porção do hipocótilo, da parte mais distal da raiz) de 0,7 a 1 cm de comprimento e inoculados no meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) com  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA e  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP, em cada frasco (unidade experimental), inocularam-se 14 segmentos distais dos hipocótilos, totalizando 189 explantes (genótipos) por progênie, as progênies foram aleatorizadas em sete Blocos com duas repetições por bloco (STEEL; TORRIE, 1980), com um total de 168 segmentos de hipocótilos por progênie.

### Modelo Matemático

$$Y_{ijk} = m + t_i + b_j + e_{ij} + d_{ijk}$$

Onde:

$Y_{ijk}$  – valor da observação k, na progênie i no bloco j;

$m$  – média da população, sem considerar o efeito de progênie.

$t_i$  – efeito devido a progênie i, com  $i=1,2,\dots,10$ ;

$b_j$  – efeito devido ao bloco j, com  $j= 1,2,\dots,7$ ;

$e_{ij}$  – erro experimental devido aos fatores não controlados, na parcela que recebeu a progênie i, no bloco j.

$d_{ijk}$  – erro amostral da observação k, dentro da progênie i, no bloco j.



Tabela 2 - Esquema de análise da variância correspondente a uma seleção entre as médias das parcelas

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>E(QM)</b>	<b>F</b>
Bloco	b - 1	Q <sub>1</sub>	$\sigma_d^2 + n\sigma_e^2 + nt\sigma_b^2$	Q <sub>1</sub> /Q <sub>3</sub>
Progênie	t-1	Q <sub>2</sub>	$\sigma_d^2 + n\sigma_e^2 + nb\sigma_p^2$	Q <sub>2</sub> /Q <sub>3</sub>
Erro experimental	(b-1)(t-1)	Q <sub>3</sub>	$\sigma_d^2 + n\sigma_e^2$	Q <sub>3</sub> /Q <sub>4</sub>
Dentro amostral	(n-1) t b	Q <sub>4</sub>	$\sigma_d^2$	-----
Total	ntb-1	Q <sub>5</sub>	-----	

### 2.7.8 Herdabilidade

A estimativa do coeficiente de herdabilidade no sentido restrito foi calculado considerando as médias das famílias, para o caráter em estudo.

As estimativas de variâncias genéticas e ambientais e de parâmetros afins para a característica regeneração *in vitro* foram obtidas pela decomposição do quadrado médio das progênie ajustado em sua esperança matemática.

A unidade de análise para calcular a herdabilidade foram as médias das parcelas.

Calcularam-se as seguintes estimativas para o cálculo do coeficiente de herdabilidade.

$$\hat{\sigma}_e^2 = \frac{Q_3 - Q_4}{2} \quad (1)$$

$$\hat{\sigma}_p^2 = \frac{Q_2 - Q_3}{14} \quad (2)$$

$\hat{\sigma}_d^2$  : Variância dentro do bloco entre parcelas.

O coeficiente de herdabilidade (3) correspondente a uma seleção entre as médias de meios-irmãos, foi obtido a partir da seguinte expressão (VENCOVSKY; BARRIGA, 1992):

$$\hat{h}_m^2 = \frac{\hat{\sigma}_p^2}{\hat{\sigma}_p^2 + \frac{\hat{\sigma}_e^2}{r} + \frac{\hat{\sigma}_d^2}{nr}} \quad (3)$$

Onde,

$\hat{\sigma}_p^2$  : é o componente da variância devida às progênies.

$\hat{\sigma}_e^2$  : é componente da variância do erro experimental.

$\hat{\sigma}_d^2$  : é componente da variância do erro amostral dentro do bloco, entre parcelas.

r: número de repetições; n: é o número de parcelas por tratamento por bloco.

## **2.8 RESULTADOS**

### **2.8.1 Germinação das sementes**

As sementes começaram a germinar quatro dias após a sua inoculação, principalmente aquelas progênes com sementes maiores. O processo de desinfestação não teve efeito negativo sobre a germinação. Aos 20 dias de idade, as plântulas apresentavam os hipocótilos e os cotilédones desenvolvidos e sem folhas.

### **2.8.2 Regeneração**

O cultivo no escuro durante os primeiros dias provavelmente favoreceu a ausência da oxidação das culturas. A oxidação ocorre como resultado dos ferimentos, exposição à luz, citocininas, idade e tipo de explante (DURAND-CRESSWEL et al., 1985). Pérez-Tornero (2000) verificou que o ANA teve efeito benéfico diminuindo a secreção de substâncias fenólicas.

Na primeira semana após inoculação, os explantes apresentaram um incremento atenuado do volume. Na sexta semana, os três tipos de explantes já apresentavam brotos em desenvolvimento. Houve diferenças quanto ao tipo de regeneração entre os cotilédones e os hipocótilos, entre tanto não houve diferenças entre os segmentos proximais e distais dos hipocótilos. Em geral, houve um incremento na regeneração de brotos até a décima semana de cultivo.

Tabela 3 - Esquema da análise da variância da regeneração a partir de plântulas de 20 dias de idade de *Eucalyptus grandis*, onde são testados 3 tipos de explantes (cotilédones, segmentos distais e proximais dos hipocótilos e 9 meios de cultura (combinações de ANA e BAP em  $\text{mgL}^{-1}$ )

Fontes de Variação	G L	S Q	QM	F	Pr>F
Blocos	5	1,58	0,31	1,18	0,3211
Meios (M)	8	47,07	5,88	21,97	<,0001
Explantes (E)	2	17,77	8,88	33,18	<,0001
E x M	16	18,95	1,18	4,42	<,0001
Resíduo	130	34,28	0,26		
TOTAL	161	119,30			
CV (%) = 25,92					

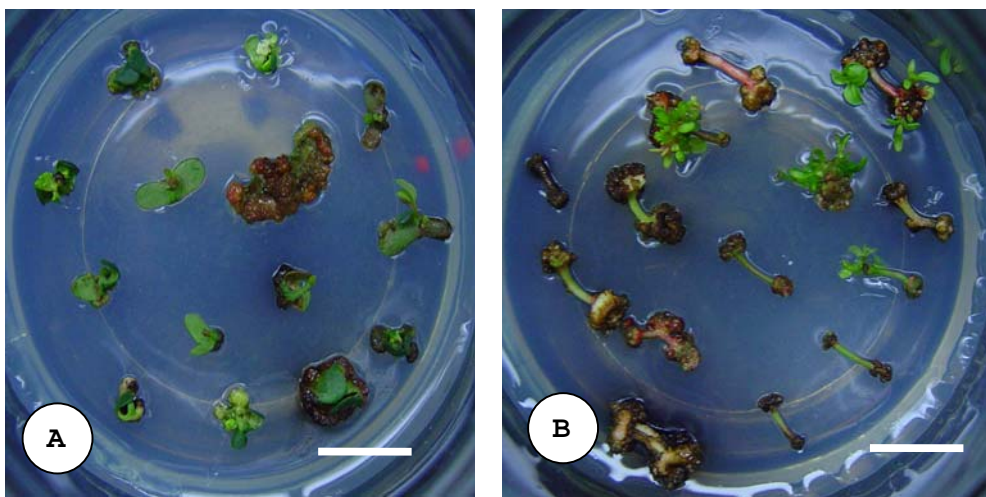


Figura 4 – Regeneração de *Eucalyptus grandis*, 4 semanas após inoculação *in vitro*, (A) cotilédones e (B) e segmentos dos hipocótilos regenerando. Barras = 1,0 cm

O efeito da interação meios de cultura x explantes (Tabela 3) na análise da variância foi significativo ( $p < 0,05$ ) como pode ser visto na Figura 5, onde os segmentos dos hipocótilos proximais e distais seguem um padrão de regeneração diferente ao dos cotilédones nos diferentes meios de cultura. Pode-se observar também os cruzamentos entre os explantes indicando a interação meios de cultura x explantes.

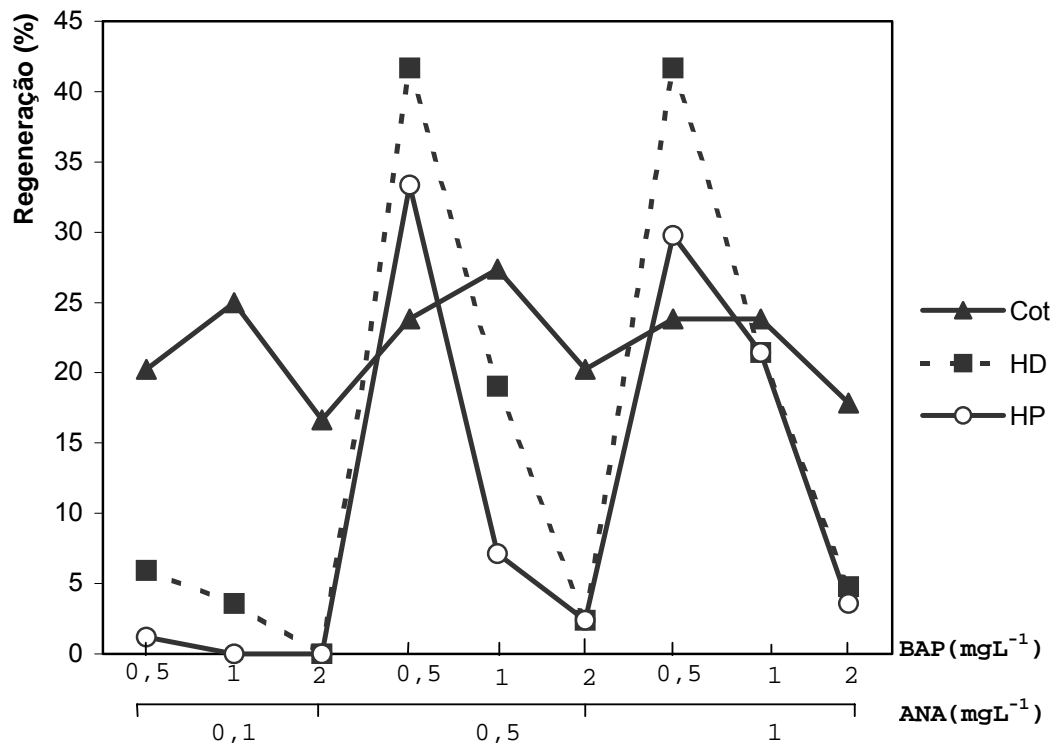


Figura 5 - Influência dos 3 níveis de ANA testados com os 3 níveis de BAP na regeneração de brotos de *Eucalyptus grandis in vitro* mostrando as interações com os explantes: cotilédones (Cot); segmentos dos hipocótilos distais (HD) e proximais (HP)

Os cotilédones tiveram uma regeneração estatisticamente superior (Tabela 4) aos segmentos dos hipocótilos na combinação de ANA 0,1 com os 3 níveis de BAP (Figura 5). Pela análise da variância, nas combinações de 0,5 e 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA com os 3 níveis de BAP não tiveram diferenças significativas quanto a regeneração, mas tiveram diferenças relevantes entre os explantes.

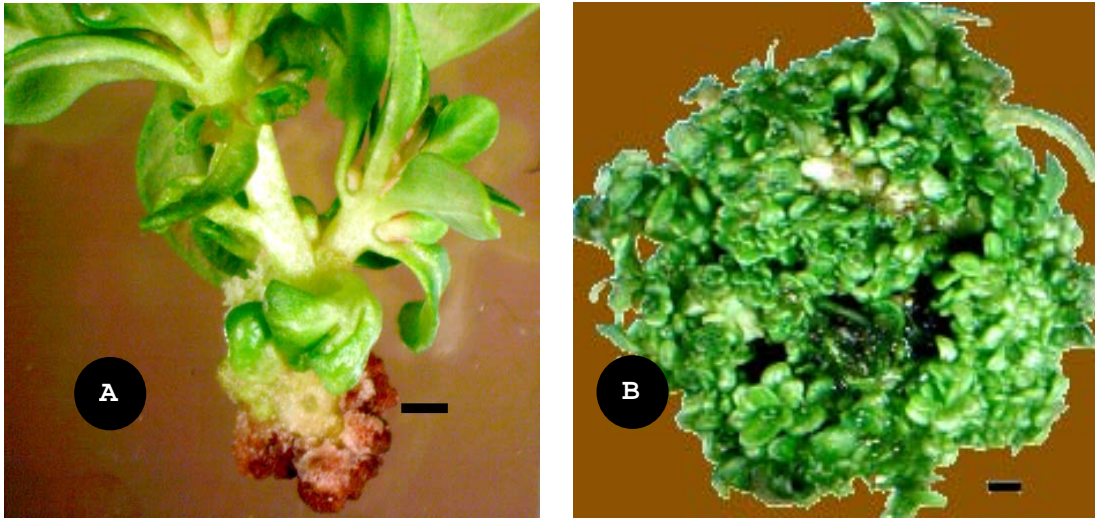


Figura 6 - Brotos regenerados *in vitro* de cotilédones de *Eucalyptus grandis*: (A) calo organogênico no extremo do corte (organogênese indireta), 8 semanas após inoculação; (B) organogênese em toda superfície do cotilédone, (organogênese direta) 8 semanas após inoculação. Barras = 1,0 mm

O cotilédone foi o melhor explante, em média da regeneração independente dos meios, como indica a média na Tabela 4, em tanto que, o melhor meio de cultura que induz regeneração, independente dos explantes foi a combinação de  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA e BAP.

Tabela 4 - Influência dos reguladores de crescimento no meio JADS (CORREIA et al., 1995) sobre as médias dos dados transformados\* de regeneração dos três tipos de explantes, 14 semanas após inoculação *in vitro*. Os explantes provêm de plântulas com 20 dias de idade, de sete progênies de *Eucalyptus grandis*

Meios de Cultura	Relação Molar		Explantes			
	ANA + BAP mgL <sup>-1</sup>	BAP/ANA μM	Hipocótilos proximais	Hipocótilos distais	Cotilédones	Médias
0,1 + 0,5		4,13	0,98 bB	1,40 bB	2,08 aA	1,51
0,1 + 1,0		0,82	0,81 bB	1,15 bB	2,60 aA	1,58
0,1 + 2,0		0,41	0,81 bB	0,98 bB	2,30 aA	1,30
0,5 + 0,5		8,26	2,85 aA	3,05 aA	2,58 aA	2,83
0,5 + 1,0		1,65	1,90 aA	2,07 aA	2,69 aA	2,24
0,5 + 2,0		0,82	1,15 aB	1,08 bB	2,40 aA	1,57
1,0 + 0,5		16,53	2,73 aA	3,00 aA	2,38 aA	2,70
1,0 + 1,0		3,30	2,39 aA	2,41 aA	2,58 aA	2,46
1,0 + 2,0		1,65	1,32 aA	1,39 bB	2,33 aA	1,68
Médias			1,66	1,86	2,44	

Letras minúsculas iguais, no sentido vertical, não têm diferenças significativas entre os meios de cultura no mesmo explante; letras maiúsculas iguais, no sentido horizontal, não têm diferenças significativas entre os explantes no mesmo meio, pelo teste Tukey-Kramer ( $\alpha = 0,05$ ); \* dados transformados para  $[x + 0,5]^{0,3}$

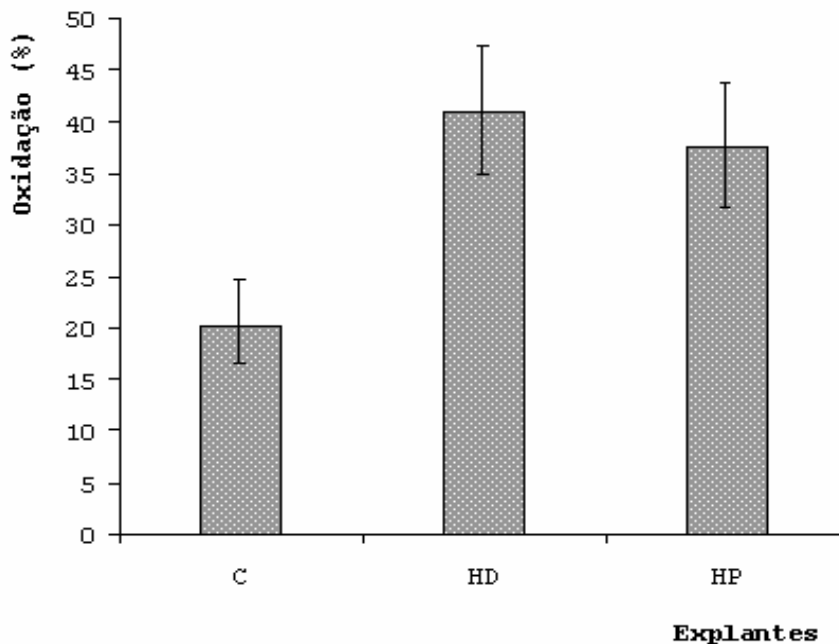


Figura 7 - Oxidação dos explantes primários que foram descartados ao longo do período de avaliação da regeneração *in vitro* de *Eucalyptus grandis* nos diferentes meios testados. C, cotilédones; HD, segmentos distais dos hipocótilos e HP, segmentos proximais dos hipocótilos. As barras são os intervalos de confiança para a média a 95% de confiança

Considerando a oxidação dos explantes (Figura 7) primários, e como resultado da análise da variância foi significativa a interação meios de cultura x explantes ( $p < 0,05$ ), as barras que se superpõem não têm diferenças significativas. Esta oxidação provavelmente reduz a capacidade de regeneração, como cita Anderson e Levinsh (2002) em pinus, sobre tudo, si este processo acontece durante as primeiras semanas de cultivo.

Os cotilédones foram os explantes que sofreram a menor oxidação, independente dos meios, com menor média (Tabela 5), em tanto que, o meio onde houve a menor oxidação, independente dos explantes, foi na combinação de  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA e BAP.



Tabela 5 – Oxidação dos explantes primários em médias dos dados transformados.\* 14 semanas após inoculação *in vitro*. Os explantes provêm de plântulas com 20 dias de idade, de sete progênies de *Eucalyptus grandis*

ANA + BAP mgL <sup>-1</sup>	BAP/ANA μM	Hipocótilo proximal	Hipocótilo distal	Cotilédones	Médias
0,1 + 0,5	4,13	6,02 aA	7,79 aA	6,4 aA	6,74
0,1 + 1,0	0,82	5,63 aA	7,55 aA	5,33 aA	6,17
0,1 + 2,0	0,41	6,85 aA	6,97 aA	3,37 aB	5,73
0,5 + 0,5	8,26	6,09 aA	5,37 aA	4,31 aA	5,26
0,5 + 1,0	1,65	6,09 aA	6,34 aA	4,08 aA	5,50
0,5 + 2,0	0,82	6,6 aA	6,32 aA	7,07 aA	6,46
1,0 + 0,5	16,53	5,24 aA	4,86 bA	3,6 aA	4,57
1,0 + 1,0	3,3	4,82 aA	5,54 aA	2,6 bB	4,32
1,0 + 2,0	1,65	6,77 aA	5,43 aA	1,71 bB	4,63
Médias		6,01	6,24	3,925	

Letras minúsculas iguais, no sentido vertical, não têm diferenças significativas entre os meios no mesmo explante; letras maiúsculas iguais, no sentido horizontal, não têm diferenças significativas entre os explantes no mesmo meio, pelo teste Tukey-Kramer ( $\alpha = 0,05$ ); \* dados transformados para  $[x+0,5]^{1/2}$

### 2.8.3 Regeneração a partir de cotilédones

Os cotilédones foram os explantes que apresentaram menor oxidação (Figura 7), descartou-se menor número de explantes pela oxidação. Os calos destes explantes mostraram crescimento contínuo até o final do experimento ficando com um tamanho proporcional ao inicial, como se pode observar na Figura 8.

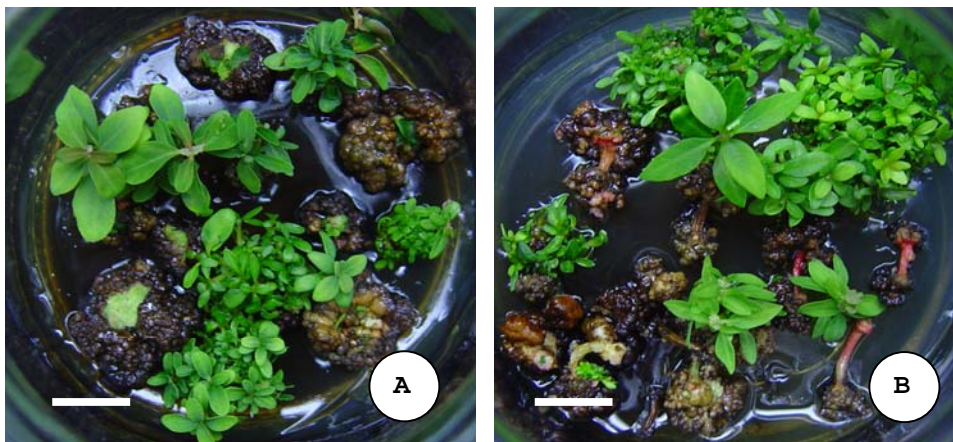


Figura 8 - Brotos de *Eucalyptus grandis* a partir de (A) cotilédones e (B) e segmentos dos hipocótilos cultivados *in vitro*, 10 semanas após inoculação. Barra = 1 cm

Quando se comparam as médias dos dados transformados da regeneração destes explantes, nos meios de cultura testados, estatisticamente não diferem entre si (Tabela 4). A regeneração dos cotilédones não superou 30% de regeneração em média (Figura 9), as maiores médias ocorreram quando se combinou  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP com as concentrações de ANA ( $0,1$ ;  $0,5$  e  $1 \text{ mgL}^{-1}$ ) apresentando intervalos de confiança com menores amplitudes.

O melhor meio considerando a média (27,38%) e o intervalo de confiança foi a combinação de ANA  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  e  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP, variando de 21,47% a 37,71%. Respostas similares às encontradas em *Eucalyptus grandis* por González (2002) e para *Eucalyptus nitens* e *Eucalyptus globulus* por Bandyopadhyay et., al (1999). Entre os explantes testados, os cotilédones apresentaram a melhor média (2,44) dos dados transformados, independente dos meios (Tabela 4), embora este explante tenha apresentado a menor porcentagem de regeneração.

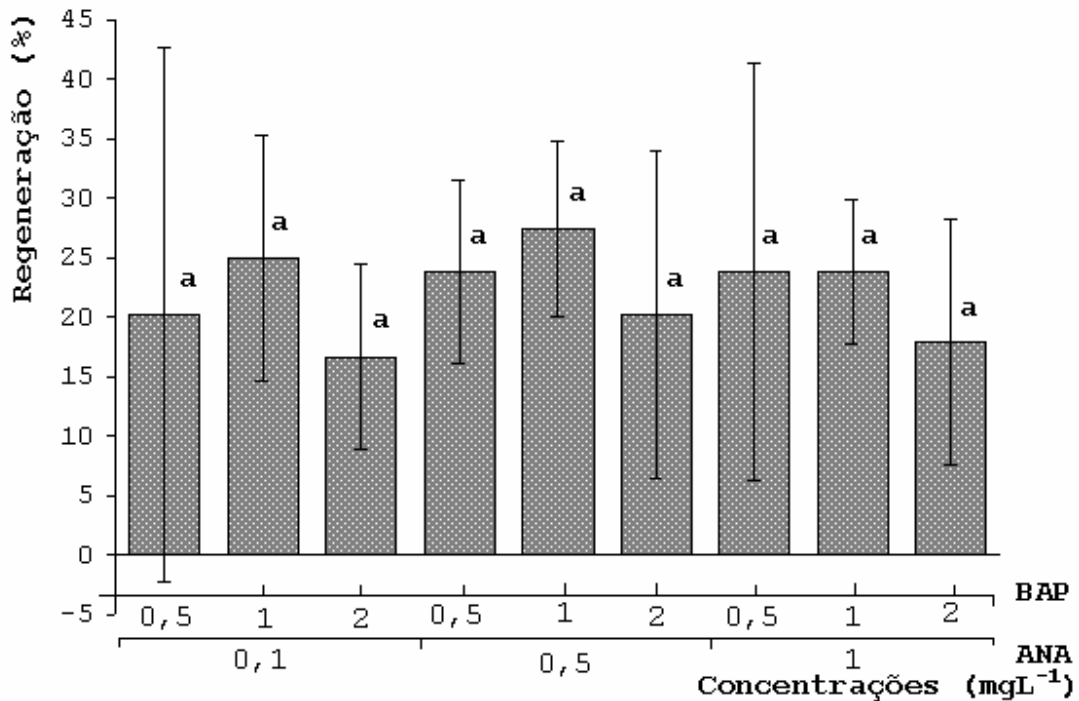


Figura 9 - Médias em porcentagem de regeneração de brotos *in vitro* a partir dos cotilédones, de sete progênies de *Eucalyptus grandis* nos diferentes meios de cultura. As barras são os intervalos de confiança para a média ao nível de 95%. Letras iguais (dados transformados) não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey-Kramer

A plasticidade dos cotilédones no desenvolvimento de brotos em todos os meios explica-se pela capacidade de regenerar direta ou indiretamente a partir dos pecíolos e dos calos originados da folha cotiledonar. Além de ter níveis endógenos adequados de reguladores de crescimento que favorecem a organogênese, pelo contrário, estes explantes são os tecidos mais determinados da plântula por possuírem um curto período de vida e pela função de reserva que cumprem. Porém, limitando a capacidade de regeneração, o que explica as baixas porcentagens de regeneração.

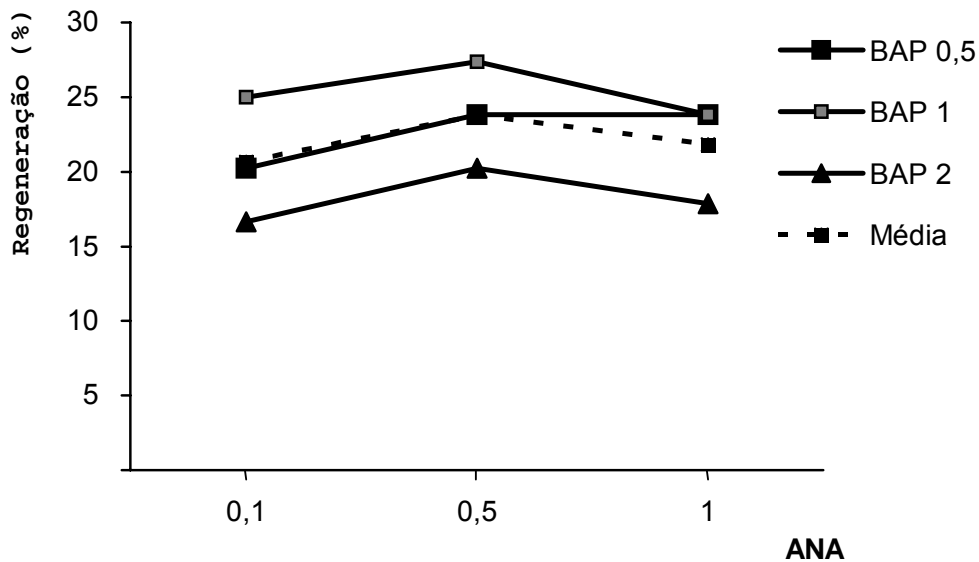


Figura 10 – Perfis da regeneração *in vitro* dos cotilédones de *Eucalyptus grandis*, segundo os reguladores de crescimento ANA e BAP em mgL<sup>-1</sup>

Na Figura 10, em geral os perfis mostram paralelismo entre si, a pesar de ter um pequeno cruzamento, pela análise da variância não houve interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre ANA e BAP. O perfil médio pode representar os perfis dos três níveis de BAP. O perfil médio de regeneração deste explante foi 22,6%, indicando um efeito considerável na regeneração.

#### 2.8.4 Regeneração dos segmentos distais dos hipocótilos

Após uma semana de inoculação, estes segmentos dos hipocótilos apresentavam coloração verde, enquanto que os proximais, uma coloração vermelha provavelmente devido às antocianinas. Três semanas após a inoculação, os explantes distais sintetizaram antocianinas iguais aos explantes proximais e incrementaram em volume. Neste período, nos extremos dos hipocótilos (sítios de corte), se formaram engrossamentos, nos explantes que regeneram observaram-se brotos (Figura 8B).

Depois da quarta semana, ocorreu oxidação em alguns explantes começando com uma leve difusão de fenóis no meio a partir das zonas de corte, tal fato talvez tenha favorecido a morte de alguns explantes primários. A oxidação destes explantes nos meios que continham  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP com todas as concentrações de ANA foi relativamente alta, como também nas concentrações de ANA  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  com todas as concentrações de BAP.

Observou-se no extremo dos segmentos, originalmente próximos aos cotilédones há maior formação de brotos (70%), nos dois extremos (20%), no extremo basal (10%) e, ocasionalmente, houve organogênese no meio dos hipocótilos. Nos meios testados, onde os hipocótilos distais não foram responsivos, os mesmos oxidaram-se gradualmente.

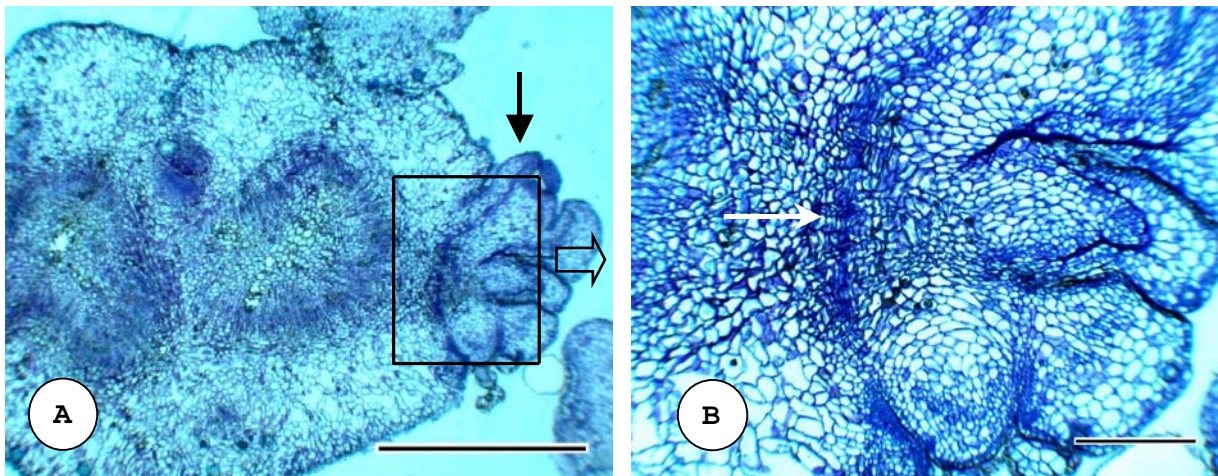


Figura 11 - Organogênese direta a partir de segmentos de hipocótilos de *Eucalyptus grandis* cultivados *in vitro*, (A) gemas adventícias (seta escura) por organogênese direta a partir das células parenquimáticas do córtex. Barra =  $25 \mu\text{m}$ . (B) aproximação da região de transição (seta) entre o córtex e os brotos neoformados. Barra =  $100 \mu\text{m}$



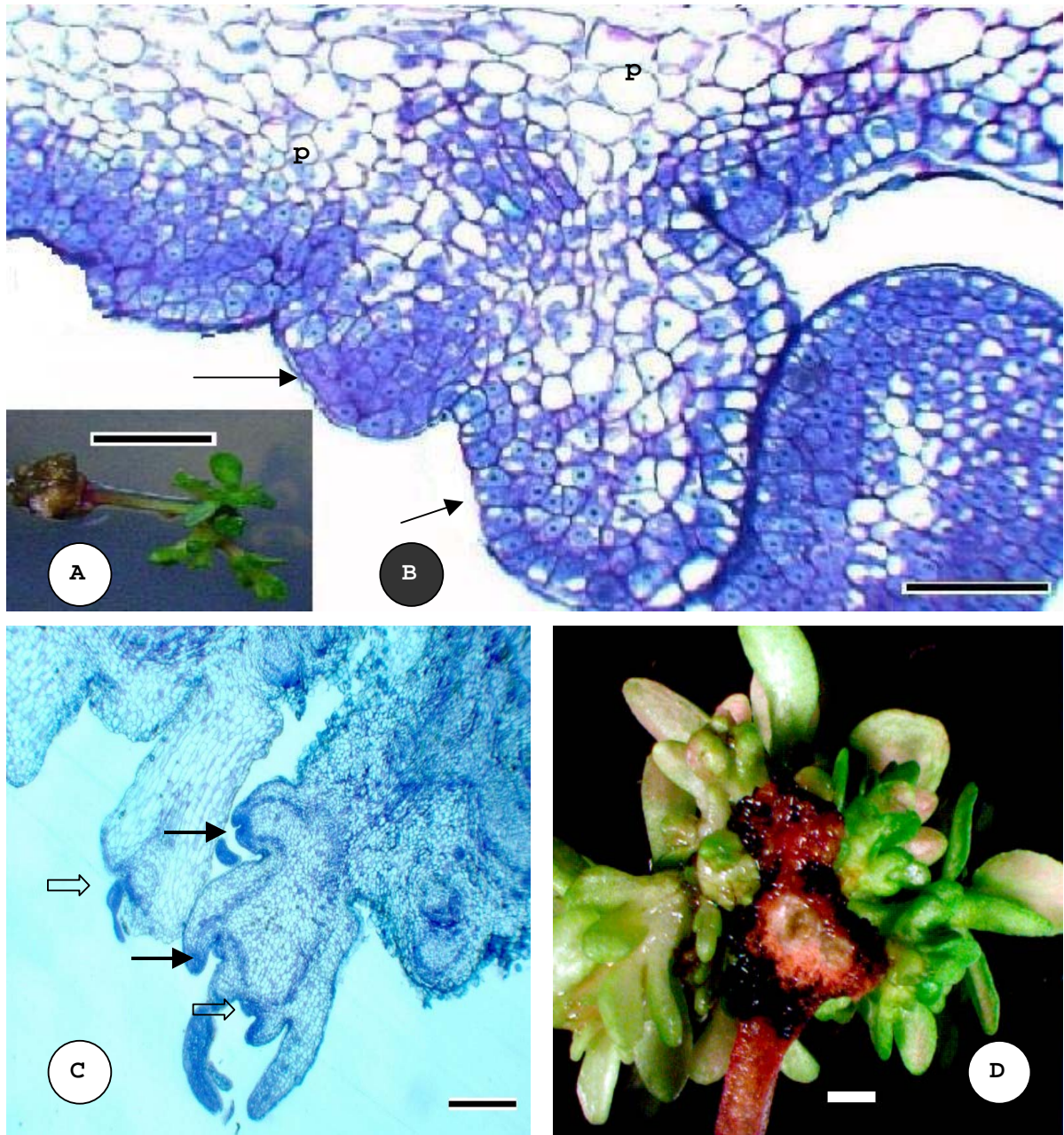


Figura 12 - Organogênese a partir de hipocótilos. (A) hipocótilo mostrando os engrossamentos nos extremos e regeneração num dos extremos. Barra = 1 cm. (B) corte transversal do engrossamento constituída de células parenquimáticas (p) e grupos de células coradas intensamente com azul de toluidina que darão origem às gemas adventícias. Barra = 100μm. (C) corte transversal do engrossamento apresentando múltiplas gemas (setas claras) com gemas axilares (setas escuras). Barra = 50μm. (D) vista geral do engrossamento do extremo do hipocótilo com os brotos originados na estrutura. Barra = 1 mm

O incremento da regeneração de brotos foi gradual ao longo das transferências realizadas (Figuras 4B e 7B).

Na Figura 13, pode-se observar que nas combinações de 0,5; 1 e 2  $\text{mgL}^{-1}$  de BAP com 0,1  $\text{mgL}^{-1}$  de ANA, os explantes não regeneraram ou foi muito baixa, como também nas combinações de 2  $\text{mgL}^{-1}$  de BAP com 0,5 e 1  $\text{mgL}^{-1}$  de ANA. Isto indica que o uso de ANA a 0,1  $\text{mgL}^{-1}$  não teve efeito no processo de regeneração (Figuras 5 e 13). Nas concentrações de 0,5 e 1  $\text{mgL}^{-1}$  de ANA com cada concentração de BAP, a medida que o BAP foi incrementado, diminuiu a regeneração. Esta diminuição da regeneração variou de 41% a 4,7% quando combinado com 1  $\text{mgL}^{-1}$  de ANA.

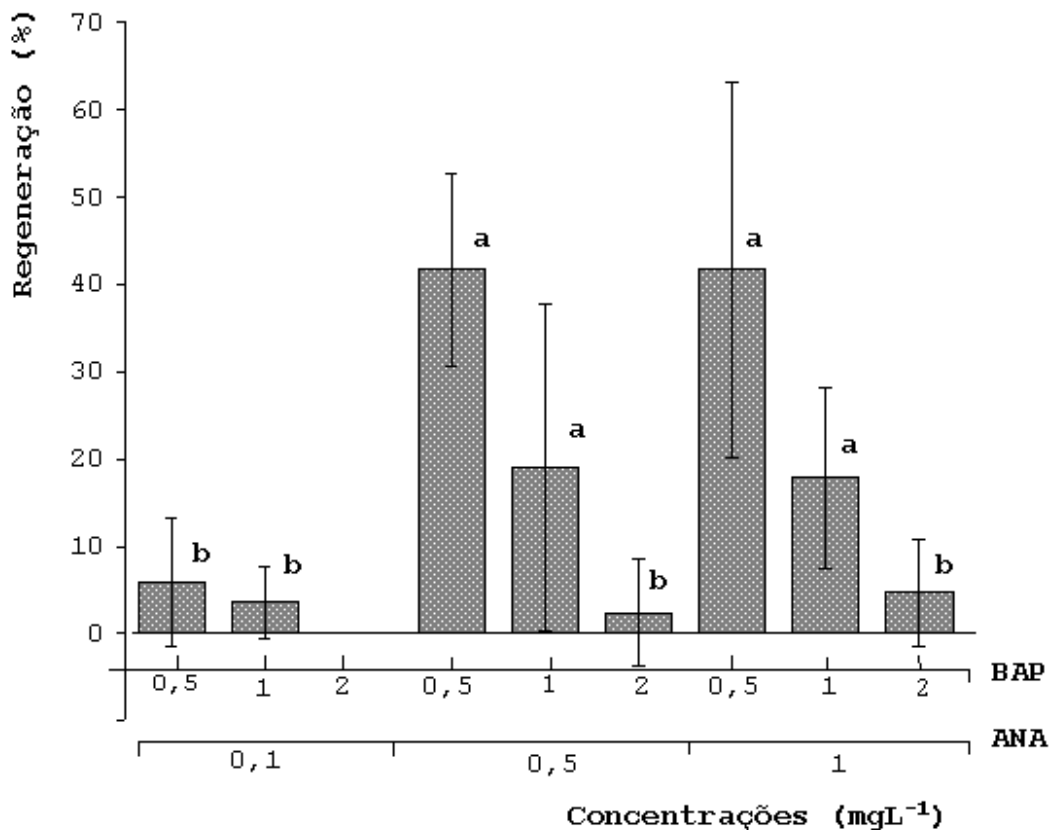


Figura 13 - Médias em porcentagem de regeneração de brotos *in vitro* a partir dos segmentos distais dos hipocótilos, de sete progênies de *Eucalyptus grandis* nos diferentes meios de cultura. As barras são os intervalos de confiança para a média ao nível de 95%. Letras iguais (dados transformados) não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey-Kramer

As maiores freqüências de regeneração ocorreram nas combinações de 0,5 e 1  $\text{mgL}^{-1}$  de ANA com 0,5 e 1  $\text{mgL}^{-1}$  de BAP. Não houve diferenças significativas entre essas combinações, entretanto houve uma diferença de 20% de regeneração entre as médias dessas combinações. A maior porcentagem de regeneração de brotos (41%), com intervalo de confiança com menor variabilidade (Figura 13), foi obtida na combinação de ANA e BAP a 0,5  $\text{mgL}^{-1}$  respectivamente, porém não houve interação significativa entre ANA e BAP indicando um efeito aditivo desses reguladores de crescimento.

Pela análise da variância não houve diferenças significativas da interação ( $p < 0,05$ ) entre ANA e BAP (Figura 14), os perfis mostram paralelismo entre si. Também se percebe que na faixa da primeira à segunda concentração de ANA houve um incremento acentuado da regeneração, exceto na concentração de BAP 2  $\text{mgL}^{-1}$ , indicando uma estabilização na terceira concentração.

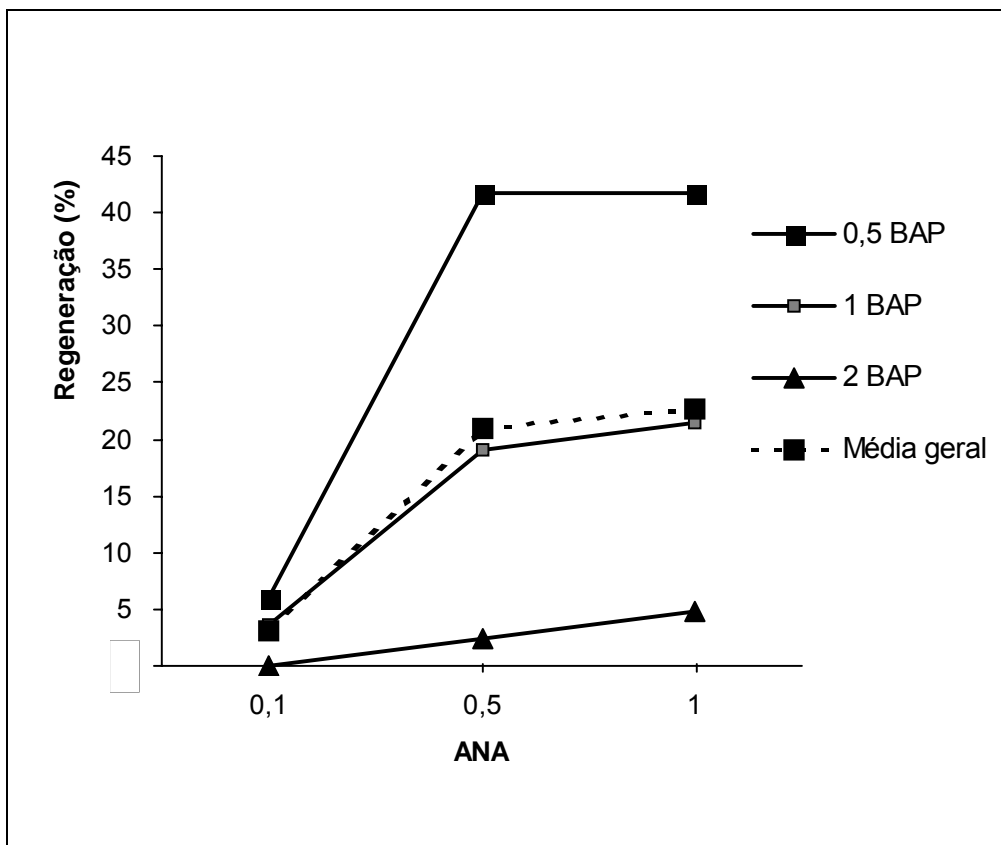


Figura 14 – Perfis médio e perfil médio geral da regeneração *in vitro* dos segmentos distais dos hipocótilos de *Eucalyptus grandis*, segundo os reguladores de crescimento ANA e BAP em  $\text{mgL}^{-1}$



Em termos de desenvolvimento, supõe-se que a interação das concentrações relativas dos dois hormônios no meio e as concentrações endógenas dos reguladores de crescimento favoreceu a regeneração por via adventícia.

Os segmentos distais dos hipocótilos são os explantes com maior competência comparada com os outros explantes testados. Estes possuem tecidos em processo de diferenciação no sentido basípeto. Provavelmente, as células não intensamente diferenciadas deste tecido são as que interagem com o meio e o ambiente formando meristemóides. Este fato é respaldado pela observação de que o extremo superior do explante regenera mais do que o inferior. As células parenquimáticas do córtex estão envolvidas neste processo (Figura 11 e 12B). Adicionalmente, este segmento do hipocótilo posiciona-se na plântula próximo ao meristema apical caulinar estando sob influência das auxinas sintetizadas no ápice caulinar, as quais participam no balanço interno de reguladores de crescimento favorecendo a regeneração (Figura 12).

### **2.8.5 Regeneração dos segmentos proximais dos hipocótilos**

Os segmentos distais e proximais dos hipocótilos nos diferentes meios foram os explantes que mais se oxidaram em relação aos cotilédones, provavelmente por ser tecidos mais sensíveis a fatores que desencadeiam oxidação, como a luz. Quanto à regeneração nas diferentes combinações de reguladores de crescimento, estes explantes seguiram, em geral, o mesmo comportamento que os segmentos distais (Figura 5), as combinações de 0,1; 0,5 e 1 mgL<sup>-1</sup> de ANA com 2 mgL<sup>-1</sup> de BAP não teve efeito na regeneração. Mesmo comportamento tem a combinação de 0,1 mgL<sup>-1</sup> de ANA com 0,5 e 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP. Quando se combinaram ANA e BAP em concentrações 1 mgL<sup>-1</sup> de cada regulador de crescimento, houve regeneração em média de 21%. Não difere estatisticamente da combinação de 0,5 e 1 mgL<sup>-1</sup> de ANA com 0,5 mgL<sup>-1</sup> de BAP (com 33 e 29% respectivamente) mas, o meio com 0,5 mgL<sup>-1</sup> de ANA e BAP foi o melhor meio por apresentar a porcentagem de regeneração maior e o intervalo de confiança menor (Figura 15), mas a regeneração foi menor que dos segmentos distais. Separar este explante do hipocótilo distal foi importante para estabelecer um gradiente da capacidade de regeneração entre estes explantes (BANDYOPADHYAY et al, 1999),

quando divididos em varias partes (GONZÁLEZ, 2002; TIBOK et al., 1995) as porcentagens de regeneração foram baixas.

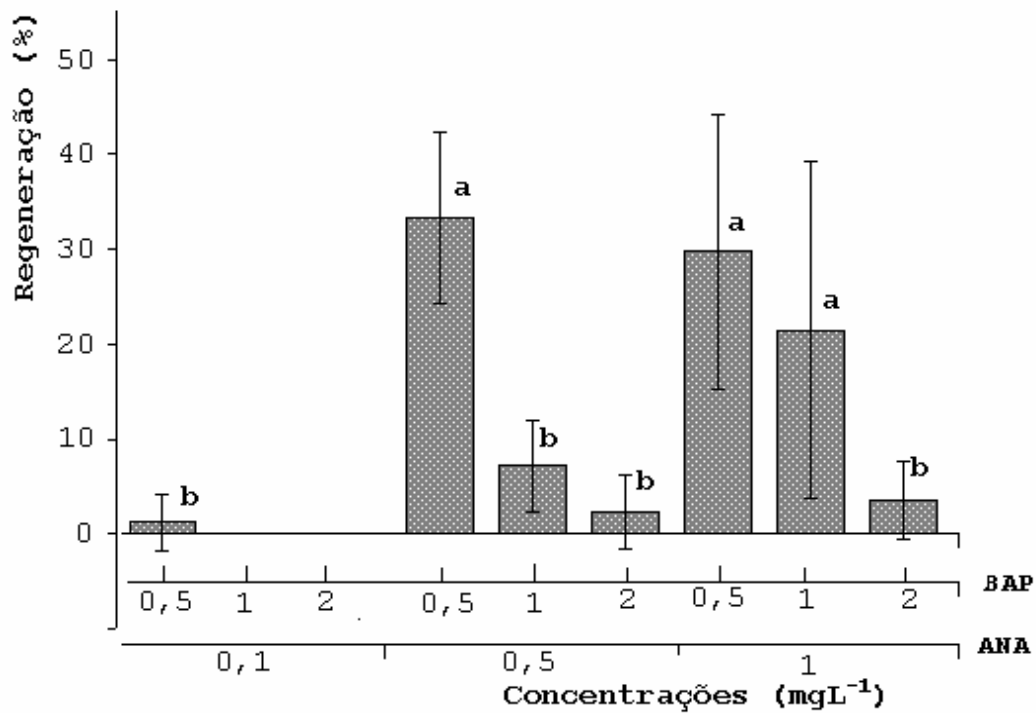


Figura 15 - Médias em porcentagem de regeneração de brotos *in vitro* a partir dos segmentos proximais dos hipocótilos, de sete progênies de *Eucalyptus grandis* nos diferentes meios de cultura. As barras são os intervalos de confiança para a média ao nível de 95%. Letras iguais (dados transformados) não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey-Kramer

A oxidação deste explante foi ligeiramente menor em relação ao hipocótilo distal (Figura 7), quando se combinou 1 e 2 mgL<sup>-1</sup> de BAP com todas as concentrações de ANA ocorreram oxidações exceto na combinação 1 mgL<sup>-1</sup> de ANA e BAP respectivamente, onde a regeneração foi significativa. O efeito das concentrações de ANA 0,1 mgL<sup>-1</sup> com todas as concentrações de BAP favoreceu ainda mais a oxidação.

Os segmentos proximais dos hipocótilos são explantes com grau de determinação intermediário entre os segmentos distais dos hipocótilos e os cotilédones. Estes possuem tecidos mais diferenciados que o segmento distal do hipocótilo. Este

grau de desenvolvimento explica o porquê da menor resposta em média de regeneração apesar de não ter diferenças significativas quanto a regeneração entre os explantes. Também foi observado que o extremo superior regenera mais do que o inferior.

Neste explante, pela análise da variância dos dados transformados a  $(x + 0,5)^{0,1}$ , houve interação ( $p < 0,005$ ) entre ANA e BAP, na Figura 16, se visualiza que a interação foi da escala, os perfis mostram falta de paralelismo entre si. Percebe-se também que na faixa da primeira à segunda concentração de ANA houve incremento significativo exceto na concentração de BAP  $2 \text{ mgL}^{-1}$ , logo ocorreu uma estabilização na terceira concentração.

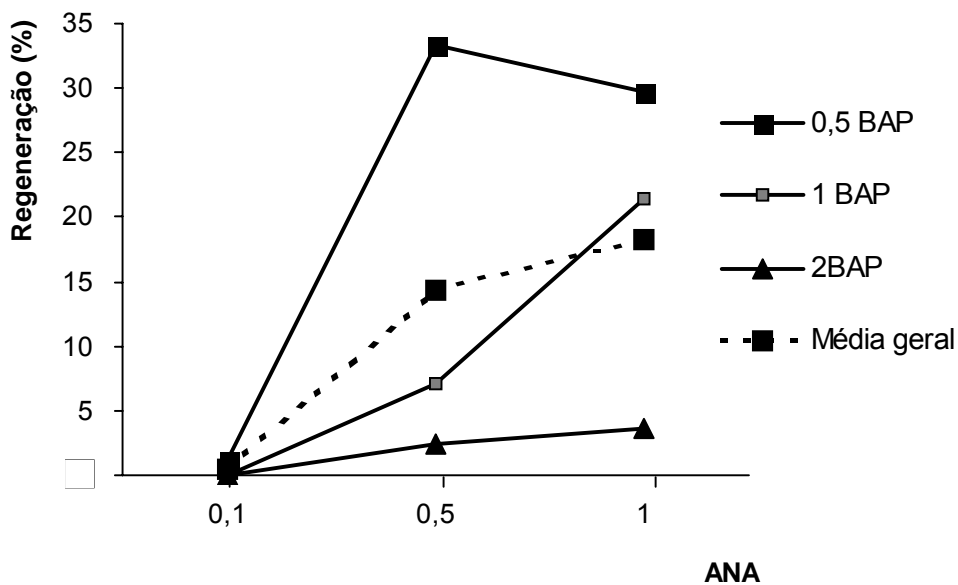


Figura 16 - Perfis médio e perfil médio geral da regeneração *in vitro* dos segmentos proximais dos hipocótilos de *Eucalyptus grandis*, segundo os reguladores de crescimento ANA e BAP em  $\text{mgL}^{-1}$

Este explante na plântula está perto da raiz e está sob influência das citocininas sintetizadas nas raízes que participam no balanço interno de reguladores de

crescimento, este aspecto teria que favorecer a organogênese, mas o grau de diferenciação prevalece no processo de regeneração.

Nenhum dos brotos regenerados dos três tipos de explantes apresentaram deformações morfológicas como a hiperhidria (ZIV, 1995), indicando que não houve efeito prejudicial dos reguladores de crescimento sobre os brotos regenerados (CASSELLS; CURY, 2001), dos nutrientes, nem do conteúdo do agar sobre a morfogênese (SAHER, et al., 2004).

Em nenhum dos explantes, houve sincronia quanto a regeneração; quando houve organogênese direta nos pecíolos cotiledonares, foi visualizado durante as primeiras três a quatro semanas; a maior parte dos brotos regenerados se observo entre a quarta e oitava semana de cultivo, ocorrendo em menor medida, até a décima semana.

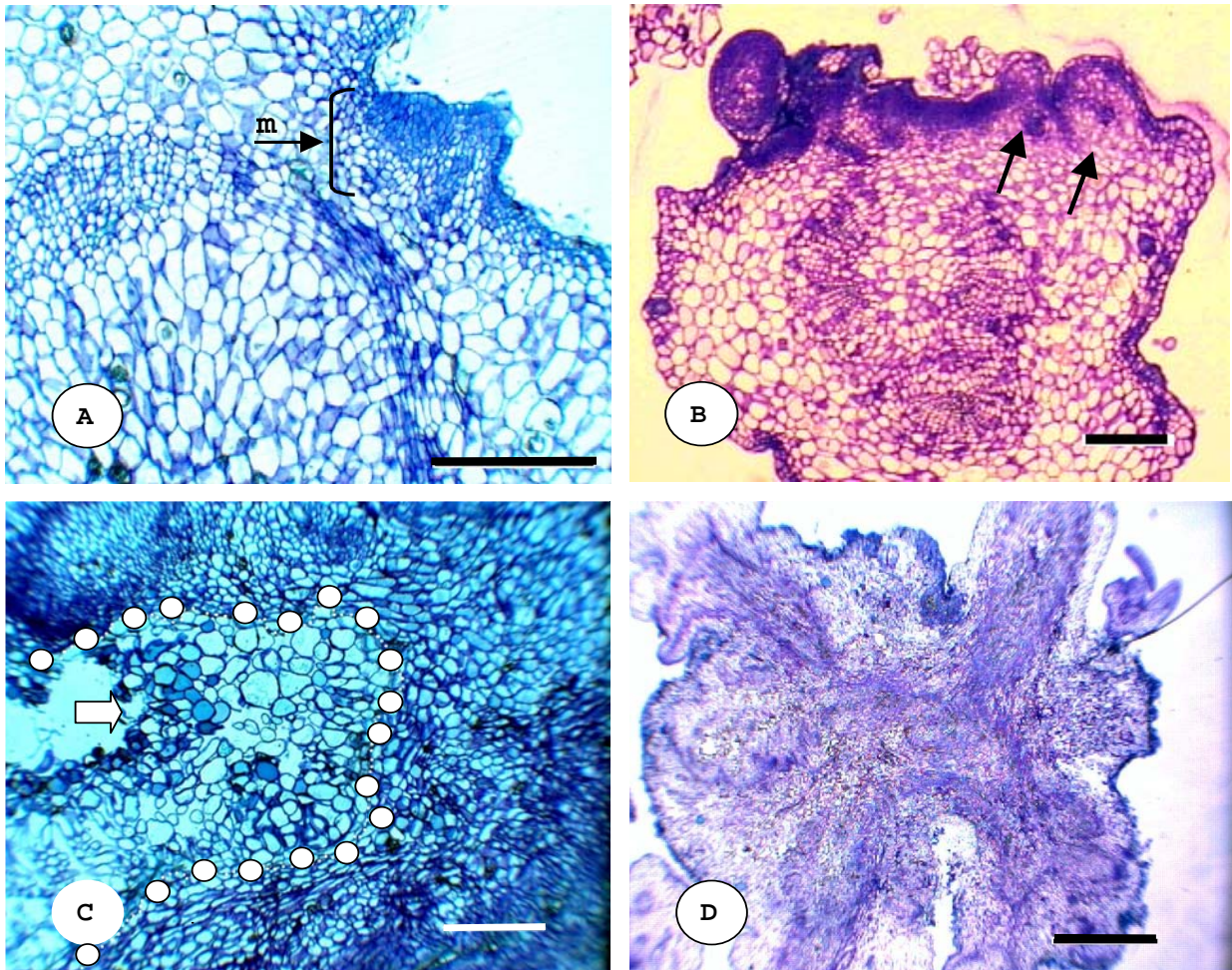


Figura 17- Regeneração dos hipocótilos de *Eucalyptus grandis*, (A) corte transversal de um extremo do segmento apresentando meristemóides (m). Barra = 100  $\mu\text{m}$  (B) meristemóides desenvolvidos (setas). Barra = 25  $\mu\text{m}$  (C) células parenquimáticas do córtex colapsadas (área delimitada e indicada pela seta). Barra= 100  $\mu\text{m}$  (D) feixes vasculares do hipocótilo original, dividindo-se em direção dos brotos neoformados. Barra = 10  $\mu\text{m}$

### 2.8.6 Células ou tecidos envolvidos na regeneração

Como a diferenciação de brotos ocorre até a décima semana de cultivo *in vitro* dos explantes, foram feitos cortes histológicos dos diferentes explantes e observaram-se pequenos calos, grupos de células meristemáticas, meristemóides, (HICKS, 1980; PUGA et al., 1991; RAMAGE; WILLIAMS, 2002). Estes meristemóides (Figura 12 A e 18 C) possuem intensa atividade nuclear tanto que, pode-se observar o nucléolo

colorido, pela alta relação núcleo plasma (RNP) (ALMEIDA, 1994), indicando uma alta atividade meristemática (Figuras 17 A e B, 18 A e C).

### **2.8.7 Histologia da regeneração dos cotilédones**

As gemas adventícias formadas nos cotilédones são originadas por duas vias, a regeneração direta, ocorre na região de corte do pecíolo (Figura 18 A e B), este fenômeno foi visualizado macroscopicamente durante as três primeiras semanas de cultivo, estudando os corte microscópicos se determino que as células parenquimáticas do córtex são as que se diferenciam em centros meristemáticas. Originando brotos (8 em total). Entretanto, esta região de corte do pecíolo apesar de não estar em contato com o meio, houve também a formação de um pequeno calo, dando origem a uma organogênese indireta (Figura 6A). A maioria dos cotilédones que regeneraram foi através da via indireta. A partir da face superficial da folha em contato com o meio de cultura, ocorreu a formação dos calos ao redor de toda a folha cotiledonar. Estes calos foram consistentes e de cor marrom-escura, centros meristemáticos ou meristemóides foram diferenciados a diferentes profundidades do calo (Figura 18C). Também a partir da epiderme da folha cotiledonar ocorre, ocasionalmente organogênese direta, tornado-se todo o explante organogênico (Fig. 6B). Neste explante, não se verificou embriogênese somática como relatam Nugent et al. (2001).

Todos as gemas adventícias formadas apresentaram o sistema vascular conectado com o tecido vascular do explante que lhe deu origem, evidenciado pelos cortes seriados das gemas (Fig 19), confirmando desta forma que a ontogenia ocorreu via organogénica e não embriogénica como relatam Pérez-Tornero et al., (2000).



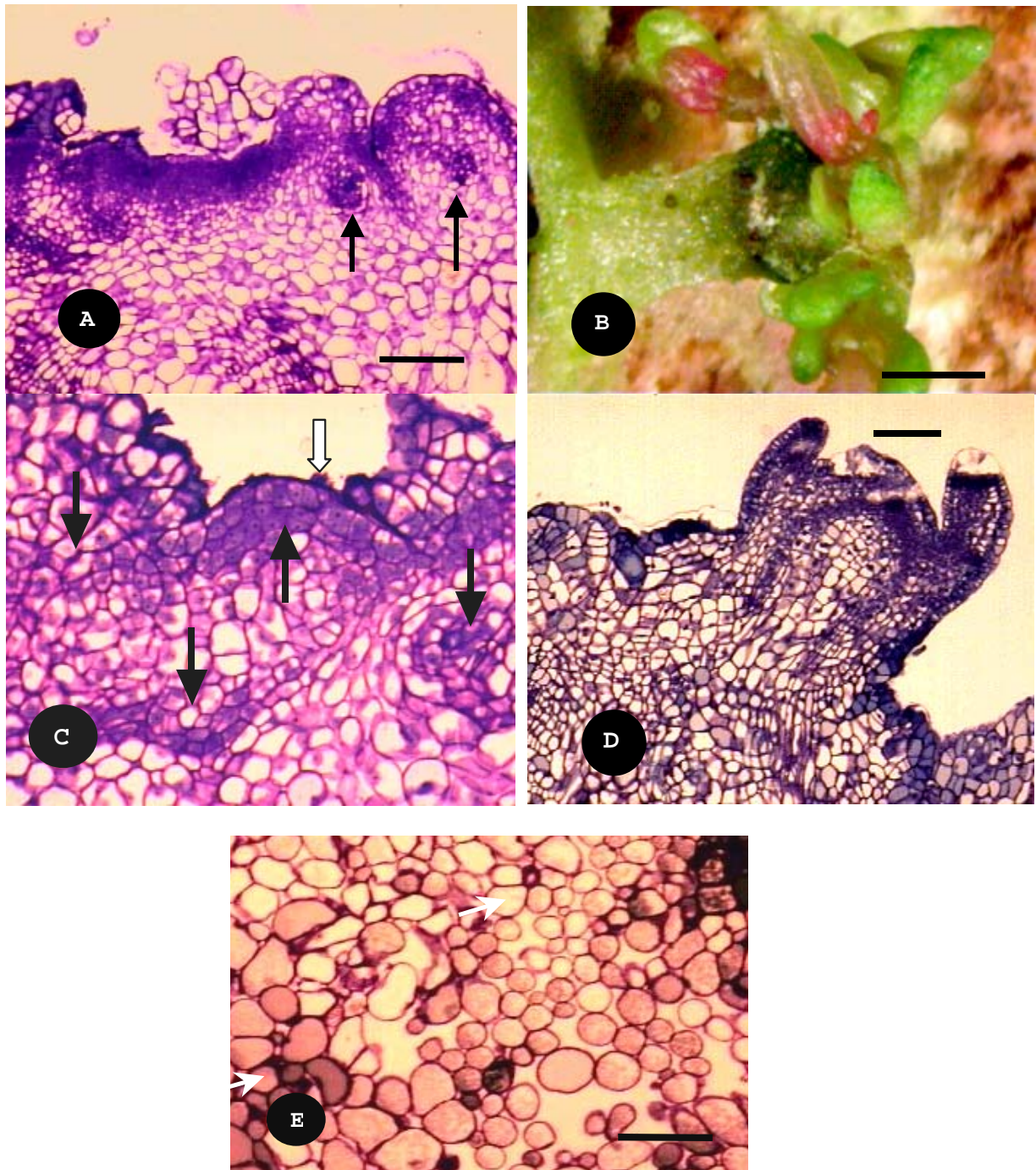


Figura 18 – Regeneração dos cotilédones de *Eucalyptus grandis* (A) direta a partir do pecíolo cotiledonar, as células parenquimáticas do córtex se diferenciam originando meristemóides (setas). Barra = 200  $\mu$ m. (B) brotos regenerados diretamente a partir dos pecíolos cotiledonares. Barra = 1 mm. (C) calo da folha cotiledonar diferenciando meristemóides a diferentes profundidades do calo, seta mostrando o acúmulo de fenóis. Barra = 200  $\mu$ m. (D) gemas caulinares na superfície de calos dos cotilédones, com múltiplas gemas. Barra = 50  $\mu$ m. (E) calo não organogênico, seta mostrando o acúmulo de fenóis. Barra = 100  $\mu$ m

### 2.8.8 Histologia da regeneração dos hipocótilos

Quatro semanas após a inoculação, os engrossamentos dos extremos dos hipocótilos apresentavam uma morfologia externa de alteres (Figura 4B e 12A), esses engrossamentos formaram-se pela divisão das células parenquimáticas do córtex que rapidamente se tornaram meristemáticas organizando-se em meristemóides para dar origem aos brotos, esta seqüência permite definir claramente a ocorrência da organogênese direta (HICKS, 1980). O sistema vascular do tecido original se divide em direção dos brotos neoformados, parte das células parenquimáticas não envolvidas na regeneração ficam colapsadas com grandes espaços intercelulares (Figura 17 C e D). No caso das estruturas que não regeneraram, as células parenquimáticas incrementaram de volume, tornando-se redondas, colapsadas com espaços grandes e numerosos formando uma estrutura frouxa, com abundante deposição de fenóis na superfície (Figuras 17C, 18E e 22A). Portanto, a regeneração destes explantes foi através de organogênese direta pela formação prévia de meristemóides como as observadas por (HERVÉ et al., 2001) com a diferença que todos os brotos apresentam conexão vascular com o explante original (Figura 19).

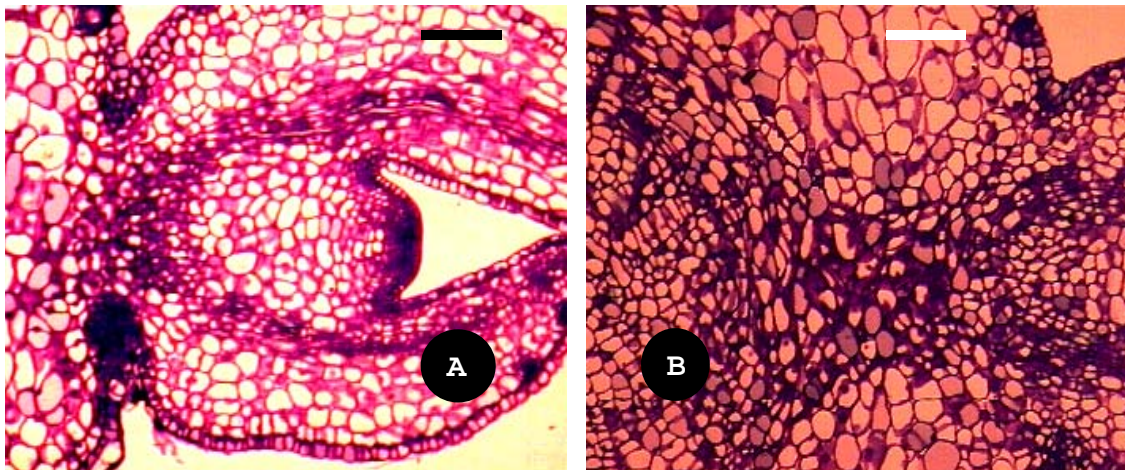


Figura 19 – Cortes transversais dos brotos neoformados de *Eucalyptus grandis* que regeneraram órgãos. (A) broto caulinar na superfície do pecíolo cotiledonar. Barra = 50 µm e (B) mostrando a conexão vascular com o tecido original. Barra = 100 µm



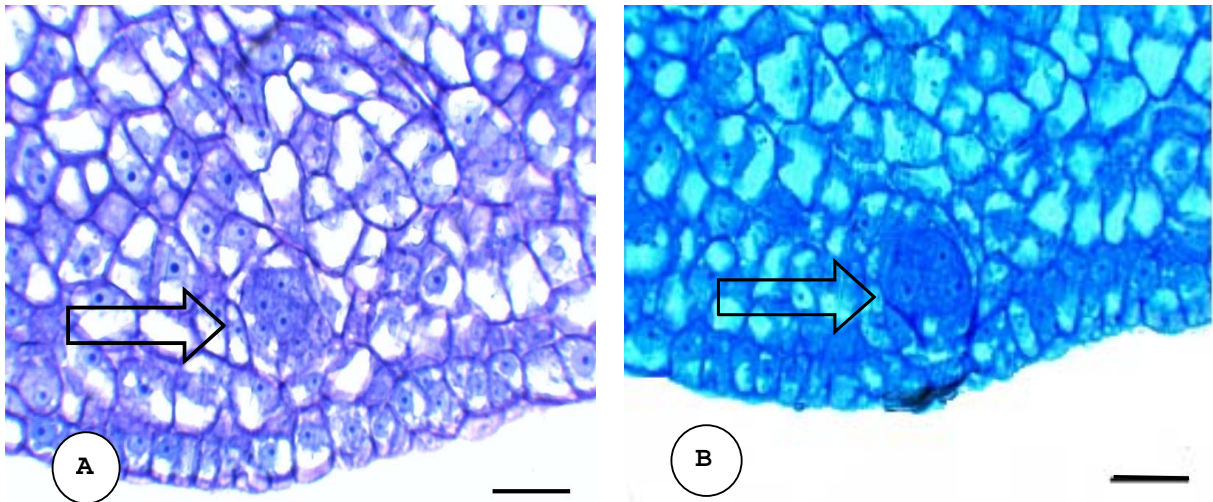


Figura 20 – Organogênese secundária em (A) e (B) grupos de células subepidérmicas (setas) que originam os órgãos secundários a partir dos brotos gerados pelos explantes primários de *Eucalyptus grandis*. Barras: 100  $\mu$ m

Na Figura 20 pode-se observar a origem da organogênese secundária a partir dos primórdios foliares gerados, onde a partir das células subepidérmicas se diferenciaram meristemóides para gerar brotos.

As estruturas não organogênicas caracterizam-se por formar calos sem organização interna, com células colapsadas, deformadas, com espaços intercelulares proeminentes, com baixa RNP e com a superfície externa escura decorrente da oxidação (Figura 18E e 21A). Segundo Cakmak et al. (1995), esta oxidação pode ser atribuída ao acúmulo de fenóis. Estes autores associam o escurecimento dos tecidos foliares, como provável consequência de acúmulo de fenóis e da atividade da polifenoloxidase (PPO), as quinonas produzidas pela ação da PPO são polimerizadas e geram pigmentos marrons. Todos os explantes liberam fenóis incluindo aqueles que regeneram estruturas organogênicas como relata González (2002), como os explantes das Figuras 4 e 7. A liberação destes compostos apresenta relação direta com o tempo de permanência dos explantes no meio, ou seja, quanto mais tempo os explantes permanecem, maior será o número de explantes que liberam fenóis, este fenômeno foi utilizado neste experimento como um indicador para realizar a repicagem, com o objetivo de diminuir o possível efeito tóxico sobre os explantes.

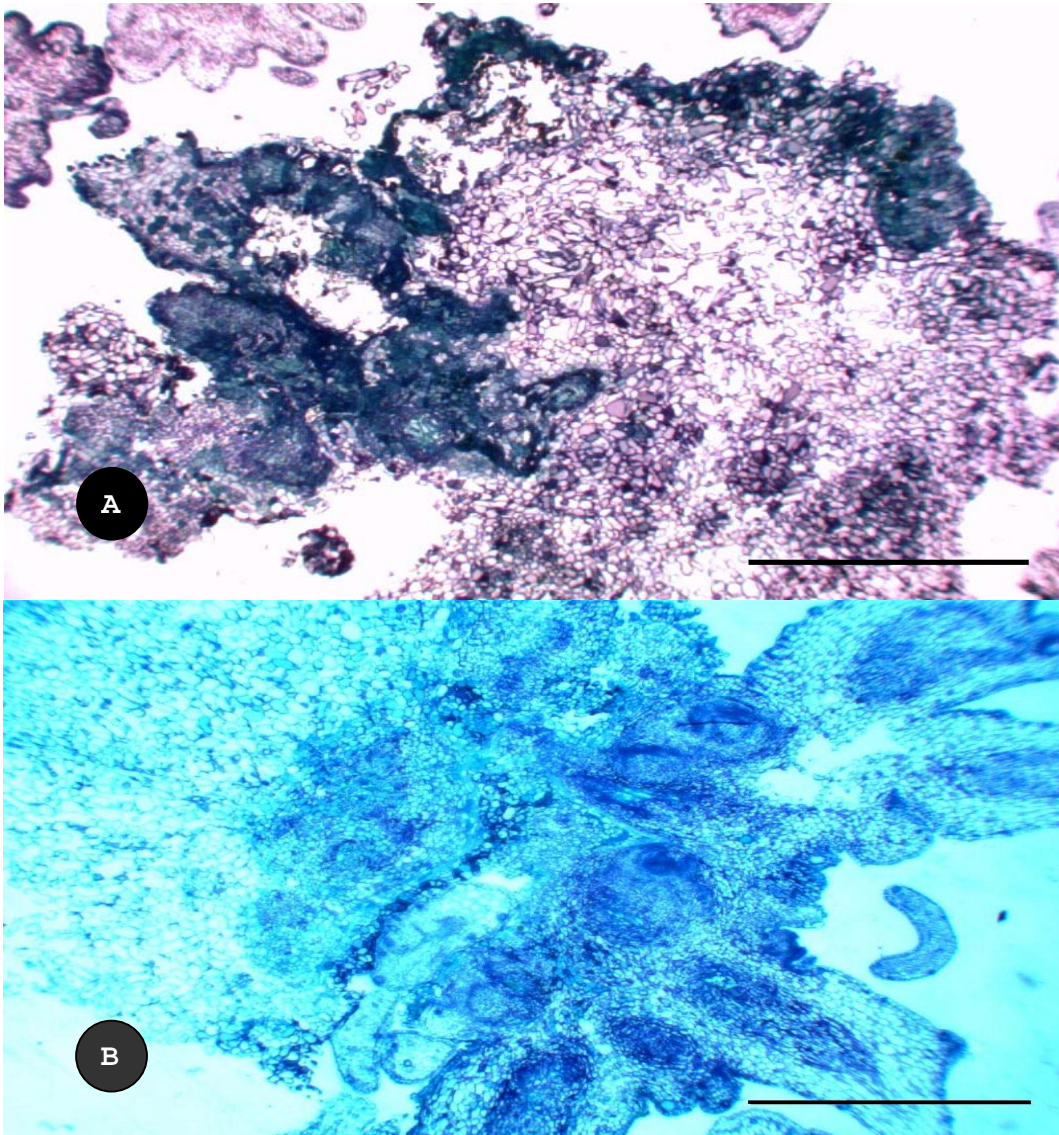


Figura 21 - Vista geral dos engrossamentos nos extremos dos segmentos dos hipocótilos de *Eucalyptus grandis* com 6 semanas de idade, (A) calo não organogênico e (B) estrutura organogênica, Barras = 25  $\mu$ m

As duas estruturas, a organogênica e não organogênica (Figura 21) originam-se a partir de células parenquimáticas corticais tanto nos pecíolos como nos hipocótilos tanto que, nos cotilédones iniciaram-se a partir do tecido epidérmico (6B).



### 2.8.9 Caracterização histológica dos meristemas caulinares

Cortes longitudinais e seriados das gemas regeneradas mostraram a formação de estruturas unipolares, com a morfologia e organização interna típica de meristemas caulinares, mostrando as células iniciais, diferenciação das células derivadas, primórdios foliares com os tecidos vasculares primários, o procâmbio no interior deles, e gemas adventícias nas axilas dos primórdios. O que permite descartar a possibilidade de embriogênese somática, onde os embriões somáticos formados, apresentariam-se como estruturas bipolares, com a presença de cordões de pró-câmbio unindo o pólo caulinar ao radicular, além da inexistência de conexão entre o sistema vascular do explante e o embrião. As células dos meristemóides são células vacuolizadas (com inúmeros vacúolos pequenos) apresentando intensa atividade mitótica, com citoplasma denso e núcleo volumoso (Figura 22).

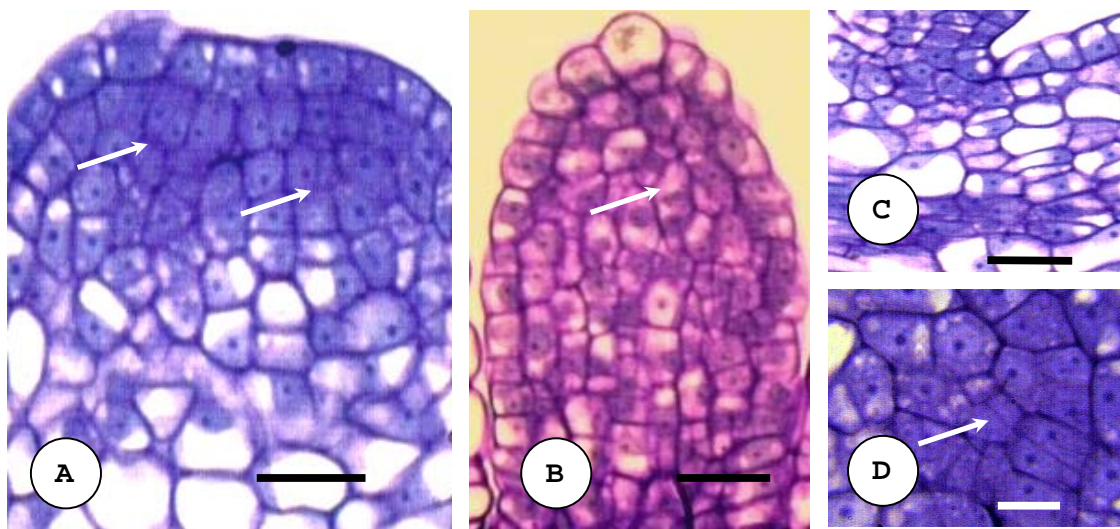


Figura 22 - Seções transversais de meristemas apicais caulinares de *Eucalyptus grandis*. (A) meristema organogênico proveniente de hipocótilo cultivado *in vitro*. (B) meristema caulinar proveniente de uma plântula de semente germinada *in vitro*. (C) formação de uma gema axilar de um broto organogênico. (D) células meristemáticas do ápice neoformado apresentando (setas) os planos da divisão celular. Barras = 20  $\mu$ m

Os alongamentos verticais destes meristemóides levam a formação de primórdios de gemas caulinares bem definidos (Figura 22), esta descrição esta de acordo com as feitas em eucaliptos e com outras espécies como soja (ALVES, 1999). As gemas assim formadas têm a mesma estrutura e organização morfológica apical que

as plântulas provenientes de sementes (Figura 22B). Pode-se também observar as divisões celulares anticlinais e periclinais das células que compõem as iniciais apicais, onde também ocorre a formação de gemas axilares (Figura 22C) a partir dos primórdios foliares seguindo o mesmo padrão de desenvolvimento do meristema apical caulinar.

### 2.8.10 Estudos dos meios de cultura na regeneração

Nos segmentos dos hipocótilos distais, a análise da variância da regressão da variável independente BAP (Figura 23) com ANA  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  (dose fixa), mostrou que a regressão linear ( $p < 0,0011$ ) é linear e significativa ( $p = 0,003$ ), o coeficiente de determinação mostrou que 61% da variação da raiz quadrada da regeneração foi explicada pela regressão linear ( $R^2 = 0,61$ ). No intervalo ( $0,1 \leq \text{BAP} \leq 1$ ), com o aumento da concentração de BAP no meio de regeneração, a raiz quadrada da regeneração diminui, segundo a equação linear. O máximo valor da raiz quadrada de regeneração se obteve com a dose mínima testada de BAP  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ .

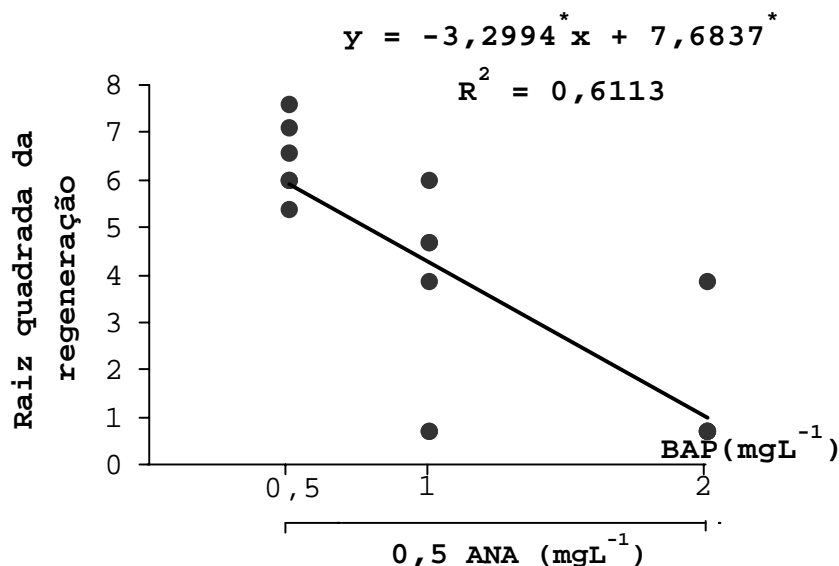


Figura 23 - Ajuste da curva de regressão quadrática com ANA fixo, dos segmentos distais dos hipocótilos de 20 dias de idade de *Eucalyptus grandis*, depois de 14 semanas de cultivado *in vitro*. \* Parâmetros significativos ao 5% de significância

Nos hipocótilos proximais, a análise da variância da regressão da variável independente BAP (Figura 24) com ANA 0,5 mgL<sup>-1</sup> (dose fixa), mostrou que a regressão linear (p= 0,001) é quadrática e significativa (p<0,005), o coeficiente de determinação mostrou que 86% da variação da raiz quadrada da regeneração foi explicada pela regressão quadrática (R<sup>2</sup>=0,86). No intervalo (0,1≤BAP≤1), com o aumento da concentração de BAP no meio de regeneração, a raiz quadrada da regeneração diminui, segundo a equação quadrática, atingindo o máximo valor da raiz quadrada de regeneração com a dose mínima testada de BAP 0,5 mgL<sup>-1</sup>. Nas figuras 23 e 24 pode-se observar que uma diminuição do BAP nos meios poderia favorecer a regeneração dos dois explantes (Figuras 23 e 24).

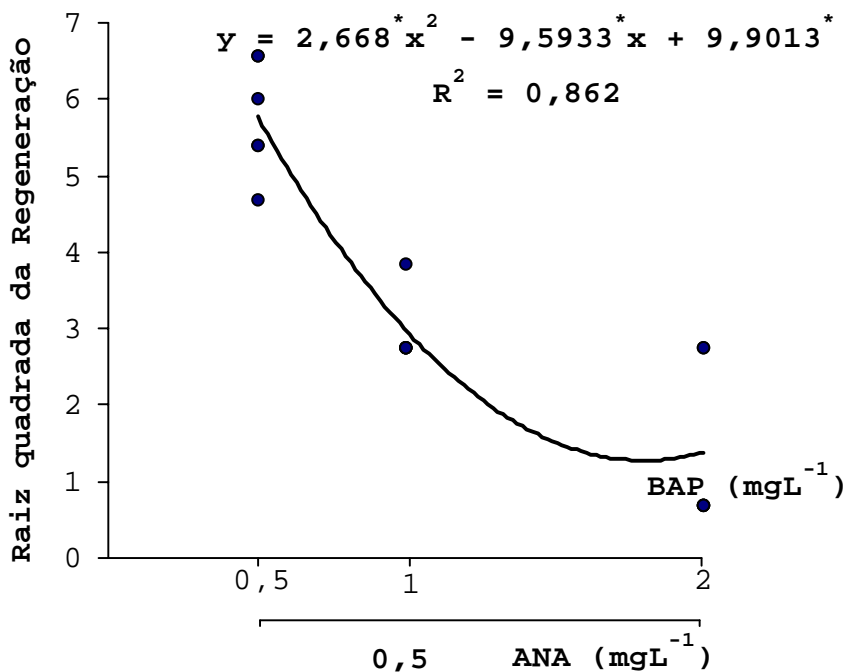


Figura 24 - Ajuste da curva da regressão quadrática dos segmentos proximais dos hipocótilos, após 14 semanas de cultivo *in vitro* de *Eucalyptus grandis*.\* Parâmetros significativos ao 5% de significância

### 2.8.11 Avaliação da capacidade de regeneração das progênes

A progênes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) quanto a capacidade de regeneração *in vitro*. O teste F relativo a progênes feito após transformação dos dados, para arco seno  $\sqrt{\text{porcentagem}}$  o F deu o valor  $F=6,55^{**}$  (gl 9; 54).

Tabela 6 - Resultados da análise da variância correspondente a uma seleção entre as médias das parcelas, da regeneração *in vitro* de dez progênes de *Eucalyptus grandis*, após 14 semanas da inoculação.

Caráter	$\hat{m} \pm s(\hat{m})$	C.V <sub>exp</sub> (%)	QM
Regeneração <i>in vitro</i>	36,77 ± 1,60	36,8	3444,4828 ***

\*\*\* Significativo ao 0,001% pelo teste F

Em relação às componentes da variância, foram os seguintes valores,  $\sigma_p^2 = 232,9621$ ,  $\sigma_e^2 = 32,2958$ ,  $\sigma_d^2 = 118,4210$ , o coeficiente de herdabilidade foi de 0,946 .

Tabela 7 - Médias das duas observações de cada progênie por bloco de regeneração *in vitro* de dez progênes de *Eucalyptus grandis* utilizando o segmento distal dos hipocótilos como explante primário

Progênes	Blocos							Média geral
	1	2	3	4	5	6	7	
8	57,64	57,64	54,07	54,07	68,36	64,78	64,78	60,19
3	54,07	57,64	43,35	64,78	57,64	61,21	64,78	57,64
5	50,50	54,07	50,50	32,64	36,21	50,50	43,35	45,39
1	43,36	68,35	39,78	21,93	43,35	43,35	32,64	41,82
10	43,36	54,07	21,93	29,07	21,93	46,93	57,64	39,27
9	57,64	39,78	32,64	25,50	46,92	36,21	29,07	38,25
4	18,36	39,78	21,93	36,21	25,50	39,78	25,50	29,58
7	14,79	29,07	18,36	29,07	32,64	11,21	25,50	22,94
6	29,07	14,78	14,79	32,64	25,50	25,50	4,07	20,90
2	11,21	11,21	14,78	14,79	14,79	11,21	4,07	11,72

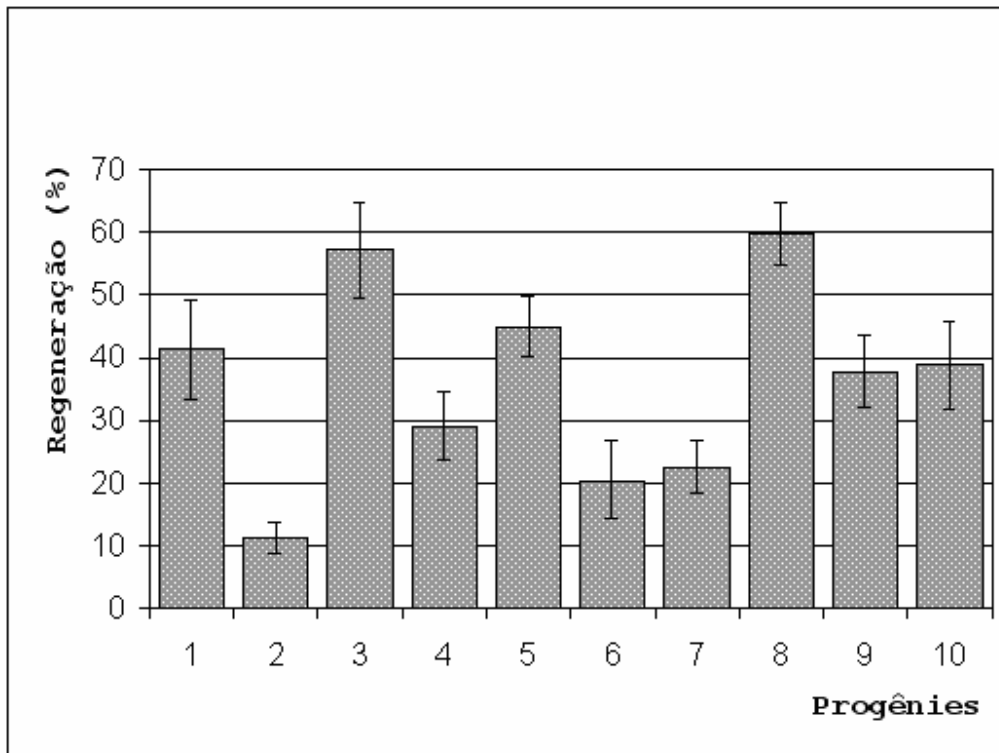


Figura 25 - Regeneração *in vitro* a partir dos segmentos distais dos hipocótilos de plântulas de 10 progênes de *Eucalyptus grandis*. Colunas representam médias de regeneração e as barras intervalos de confiança ao nível de 95%

O erro experimental no ensaio da regeneração *in vitro* dentro de cada progênie foi baixo, como pode ser visto nos intervalos de confiança da Figura 25. A variabilidade entre as progênes foi alta, variando desde 11% até 60% de regeneração, isso indica diferenças acentuadas entre progênes.

## 2.9 DISCUSSÃO

A permanência de 4 dias no escuro, na fase inicial da cultura dos explantes, provavelmente inibiu a liberação de fenóis porque a exposição dos explantes primários à luz provoca uma oxidação (SUBBAIAH e MINOCHA, 1990). O incremento de ANA no meio, além de ter um efeito organogênico em combinação com o BAP, provavelmente, eliminou o efeito da secreção de substâncias fenólicas dos explantes primários (PÉREZ-TORNERO et al., 2000). Neste sentido, o BAP teve um efeito contrário ao reportado por HERVÉ et al. (2001).

O estudo mostrou diferenças entre os padrões de regeneração *in vitro* dos três explantes juvenis testados, mostrando potenciais diferentes de regeneração nas combinações de ANA e BAP. Os cotilédones não tiveram diferenças significativas nos nove meios de cultura, a maior frequência de regeneração (27%) foi similar e ao obtido por González (2002) e superior ao obtido por Mendes-da Glória (2004), resultados similares foram obtidos em *Eucalyptus nitens* e *Eucalyptus globulus* (AZMI, et al., 1997; BANDYOPASHYAY et al., 1999) e superiores em *Eucalyptus globulus* (NUGENT et al., 2001). A regeneração dos hipocótilos foi superior ao dos cotilédones, tanto em quantidade de brotos por explante como numero de explantes, ao contrario do obtido por González (2002) em *Eucalyptus grandis* e por Bandyopadhyay et al., (1999) em *Eucalyptus nitens* e *Eucalyptus globululus* concordando com outras espécies de *Eucalyptus* (AZMI et al., 1997; NUGENT et al., 2001; TIBOK et al., 1995; WARRAG et al., 1991). Porém, os segmentos distais dos hipocótilos tanto quanto os proximais tiveram frequências de regeneração acima de 41%, sendo os valores mais altos para o segmento distal, indicando diferenças quanto à capacidade de regeneração entre os segmentos distais e proximais dos hipocótilos (BANDYOPADHYAY et al., 1999). As diferenças quanto à regeneração entre os segmentos proximais e distais dos hipocótilos poderia ser explicado pelo gradiente interno de reguladores de crescimento (BANDYOPADHYAY et al., 1999), pelo grau de determinação dos tecidos (TRAN THANH VAN, 1973) para responder a estímulos hormonais. A alta capacidade de regeneração de explantes jovens é explicada pela maior competência dos tecidos (CHRISTIANSON e WARNICK, 1988), alta atividade metabólica e uma adequada concentração hormonal endógena (SKOOG e MILLER, 1957), como resultado de um



equilíbrio entre as concentrações internas e as supridas externamente com o meio, além de uma interação com os nutrientes (RAMAGE e WILLIAMS, 2002).

Comparando os cotilédones com os dois segmentos dos hipocótilos, estes foram mais responsivos às variações dos reguladores de crescimento, seguiram um mesmo padrão de regeneração entre eles. Nestes explantes, a combinação de ANA  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  com as três combinações de BAP não houve efeito da interação em favor da regeneração, indicando que o ANA, nesta concentração, não foi suficiente para desencadear o processo. Em cada concentração de ANA a  $0,5$  e  $1 \text{ mgL}^{-1}$ , houve interação com os três níveis de BAP ocorrendo uma diminuição da regeneração com o incremento do BAP (Figura 5). Embora, esta citocinina seja um regulador de crescimento eficiente na indução de brotos (DEL PONTE et al., 2001), genes envolvidos no metabolismo hormonal ou nas vias de tradução de sinal podem causar um efeito negativo das citocininas (ZHANG e LEMAUX, 2004). As combinações dos dois reguladores de crescimento foram necessários, com uma tendência a diminuição do BAP e incremento do ANA para favorecer a regeneração. Entretanto, o sucesso do desenvolvimento de uma via e espécie em particular está determinada, usualmente por manipulação empírica dos componentes do meio, principalmente reguladores de crescimento e nutrientes minerais (HENRY; VAIN; BUYSER, 1994; RAMAGE; WILLIAMS, 2004).

Considerando as concentrações relativas (ANA/BAP em  $\mu\text{M}$ ) e na presença de razões iguais às respostas dos hipocótilos foram diferentes. O fator crítico para a regeneração não foram as concentrações relativas como o demonstrado por Skoog e Miller (1957), mas a morfogênese teve incremento com o incremento da razão e não houve formação de calos conspícuos.

Apesar de que os pecíolos cotiledonares não estiveram em contato com o meio de cultura foi verificada uma organogênese direta na região do corte. Estes tecidos adquiriram competência mais rapidamente, tanto que são visíveis nas primeiras três a quatro semanas de cultivados *in vitro*, embora, o número de explantes que regeneraram por esta via foi reduzido. No entanto, a maioria dos cotilédones que regeneraram formaram calos conspícuos previamente ao redor da lamina cotiledonar.

A regeneração dos três tipos de explantes ocorre por duas vias. Quando os pecíolos cotiledonares estão envolvidos no processo, ocorre uma regeneração direta e quando as laminas formaram inicialmente calos e brotos a partir destes calos, o processo é denominado regeneração indireta (HICKS, 1980), no caso dos hipocótilos a regeneração é por via direta.

Houve engrossamentos nos extremos dos hipocótilos, decorrente de divisões das células parenquimáticas do córtex, dando origem a pequenos calos compactos com células não organizadas, estes engrossamentos provavelmente ocorrem como resposta à absorção de nutrientes e reguladores de crescimento (SARWAR; SKIRVIN, 1997) promovendo rapidamente divisões celulares na superfície de corte (NUGENT, et al., 2001). Não foram encontradas protuberâncias, como descreve Hervé et al., (2001), porque os hipocótilos não têm estruturas meristemáticas preformadas; nem foram encontramos estruturas esféricas (WARRAG; LESNEY; ROCKWOOD, 1991). Apesar dos calos formados, só houve regeneração direta nos hipocótilos, a partir das células corticais. De modo geral, a regeneração foi semelhante à descrita por Azmi et al., (1997) com a diferença que os brotos são regenerados somente por via direta, apresentam conexão vascular como o tecido original e não possuem relação com as glândulas oleosas. A organogênese *in vitro* que conduz à formação de raízes e brotos unipolares como resposta a sinais de indução (PHILLIPS, 2004) sob condições controladas permitiu a determinação a nível histológico das células ou tecidos que estão envolvidos no processo. Como consequência da biossíntese de auxinas nos meristemas e primórdios foliares dos brotos, ocorre um transporte polar das auxinas que promove a diferenciação de células vasculares (JACOBS, 1952; ALONI, 2005) a partir das células parenquimáticas do córtex, este fato permite a conexão vascular do broto com o tecido original.

Também, foi verificada organogênese secundária a partir de brotos gerados por organogênese primária nos hipocótilos, onde células epidérmicas e subepidérmicas das folhas estão envolvidas neste processo. Pela ocorrência da organogênese secundária e o desenvolvimento de gemas axilares é explicada a abundante formação de brotos.

A seleção para regeneração *in vitro* pode ser mais eficiente entre médias de famílias do que dentro de famílias.

O coeficiente de variação experimental (36,8%) de progênies para o caráter estudado foi alto, porém o número de repetições foi suficiente para compensar essa baixa precisão, a qual provavelmente deve-se a que cada explante representa um genótipo dentro das progênies.

Como foram fixados o meio de cultura e o explante e ante uma acentuada diferença de organogênese entre progênies, se afirma que há influência do genótipo na capacidade organogénica nestas progênies, estas diferenças foram observadas em espécies arbóreas como herbáceas (LAINÉ; DAVID, 1994; NESTARES, et al., 2002; PARK et al. 1993; TANG et al., 2001) quando a capacidade de regeneração, a razão destas diferenças não se conhece profundamente, mais estariam indicando que são genes e poucos que controlam este caráter, como acontece em espécies herbáceas (HENRY; VAIN; BUYSER, 1994), que estariam envolvidos em vários aspetos da morfogênese (PHILLIPS, 2004), possibilitando uma relativa rápida incorporação destes caracteres em outros genótipos.

Estas diferenças entre progênies poderiam servir para estudar outros caracteres *in vitro* e correlacionar estes com os expressados *in vivo*.

A herdabilidade estimada para este caráter *in vitro* é considerada alta, e não é diferente de outros caracteres estudados *in vitro* em outras espécies (NESTARES et al., 2002).

Melhorar genótipos com caracteres *in vitro*, como o enraizamento em *Eucalyptus globulus*, reportado por Ruaud et al. (1999), abre a possibilidade de transferir caracteres de interesse a genótipos mais recalcitrantes, embora, estudos neste sentido em eucaliptos ainda é limitado. Os resultados indicam que é possível trabalhar no melhoramento dos genótipos utilizados no presente estudo. A variância genética aditiva foi a maior componente da variância genética, a herdabilidade estimada foi alta, indicando que a estratégia de melhoramento por seleção recorrente (KIELLY; BOWLEY, 1997) seria perfeitamente realizável.

A polinização nesta espécie é cruzada (CHAIX et al., 2003; MORI, 1993), porém a regeneração *in vitro* nesta amostra, tem uma forte influência materna desde que a variabilidade dentro de cada progênie é pequena, como mostram os intervalos de confiança.

De acordo aos resultados da regeneração em termos de médias, as diferenças são muito divergentes dentro da amostra estudada, estudos mais amplos neste sentido poderiam explicar o comportamento deste caráter dentro da população, assim como a amostragem a ser realizada.

### 3 CONCLUSÕES

Os diferentes explantes avaliados quanto à capacidade de regeneração nos meios de cultura testados responderam de maneira diferenciada quanto ao grau de determinação de cada tecido. Os explantes cotiledonares são os mais plásticos e mais competentes quanto à regeneração em todos os meios de cultura testados.

Na combinação de ANA e BAP a  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  respectivamente, os segmentos dos hipocótilos distais são os mais eficientes na regeneração. Este meio de cultura e este explante foram definidos para determinar a influencia genética na regeneração *in vitro* de progênies de *Eucalyptus grandis* da população estudada.

Variações genéticas entre e dentro de progênies de meios irmãos quanto a regeneração *in vitro* foram detetadas nesta população. A população base estudada tem variabilidade genética para regeneração *in vitro*, mostrando um potencial para ser explorado. Houve diferenças quanto à regeneração *in vitro* entre as progênies, variando entre 11 e 60% para as progênies de menor e maior regeneração respectivamente.

A herdabilidade encontrada entre progênies dentro da amostra foi alta, indicando que 94% da regeneração *in vitro* está controlado por fatores genéticos.

## REFERÊNCIAS

ALONI, R. Free auxin production and vascular differentiation in *Arabidopsis* leaves.

**Plant Physiology Online**, Sunderland, April. 2005. Disponível

em: <<http://www.plantphys.net/printer.php?ch=19&id=283>>. Acesso: em 22 Jun. 2005.

ALVES, A.C. **Estudos anatômicos da organogênese *in vitro* de soja e otimização do processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens***. 1999. 109p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

ALMEIDA, M. **Emprego do cultivo "*in vitro*" para a multiplicação vegetativa de pupunha (*Bactris gasipais* H.B.K.) Palmae**. 1994, 100p. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

ANDERSONE, U.; IEVINSH, G. Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds *in vitro*. **Annals of Botany**, Oxford, v.90 n.2, p.293-298, 2002.

AZMI A.; NOIN M.; LANDRÉ P.; PROUTEAU M.; BOUDET A.M.; CHIRQUI D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulos* Labill. hypocotails: ontogenesis and level of the regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.51 n.1, p.9 -16, Jan. 1997.

BANDYOPADHYAY, S.; HAMILL J.D. Ultrastructural studies of somatic embryos of *eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. **Annals of Botany**, Oxford, v.86, n.2, p.237-244, Aug. 2000.

BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSEN, G.; HAMILL, J.D. Efficient plant regeneration from seedlings explants of two commercially important temperate eucalypt species – *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus*. **Plant Science**, Washington, v.140, n.2, p.189 -198, Jan. 1999.

- BANZATO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: Funep, 1995. 147p.
- BARRUETO-CID, L.P. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.56, n.1, p.17-23, Jan. 1999.
- BOX, G.E.P.; COX D.R. "An Analysis of Transformation" (With discussion), **Journal of the Royal Statistical Society (B)**, Bristol, v.26, n.2, p.211-252, 1964.
- CAKMAK, I.; KURZ, H.; MARSCHNER, H. Short-term effects of boron germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 95, n.1, p. 11-18, Sept. 1995.
- CAMPINHOS, E.J.; IKEMORI, Y.K. Nova técnica para produção de mudas de essências florestais. **IPEF**, Piracicaba, v.23, p.47-52, abr. 1983.
- CASSELLS, A.C.; CURY, R. Oxidative stress and physiological, epigenetic and variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.64, n.2/3, p. 145-157, Jan. 2001.
- CHAIX, G.; GERBER, S.; RAZAFIMAHARO, V.; VIGNERON, P.; VERHAEGEN, D.; HAMON, S. Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.107, n.4, p. 705-712, Aug. 2003.
- CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis *in vitro* as a developmental Process. **HortScience**, St. Joseph, v.23, n.3, p.515-519, June. 1988.

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

CURUK, S.; ELMAN, C.; SCHLARMAN, O.; SAGEE, O.; SHOMER, I.; CETINER, S.; GRAY, D.J.; GABA, V. A novel pathway for rapid regeneration from the proximal zone of the hypocotyls of melon (*Cucumis melo* L.). **In vitro Cellular and Development Biology - Plant** v.38, n.3, p.260-267, June. 2002.

CUTTER, E.G. **Anatomia Vegetal Parte II. Órgãos Experimento e interpretação**. São Paulo: Roca, 1987. cap. 2, p.47-84: O caule- crescimento primário.

DEL PONTE, E.M.; MATTEI, V.L.; PETERS, J.A.; ASSIS, T.F. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *Globulus* Labill. **Revista Árvore**, Viçosa, v.25, n.1, p.1-8, jan.-mar. 2001.

DODEMAN V.L.; DUCREUX G.; KREIS M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany** Oxford, v.48, n.313, p.1493-1509, Aug. 1997.

DROUAL, A.M.; HAMDI, S.; CRECHE, J.; KEVERS, C.; RIDEAU, M. Autonomy to plant growth regulators and gene expression in Periwinkle cultures '*in vitro*'. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.153, n.5/6, p.623-630, Nov. 1998.

DURAND-CRESSWEL, R.; BOULAY.; FRANCKET, A. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. cap.6, p.150-181.



GONÇALVES J.L.M de. Principais solos usados para plantações florestais. In: GONÇALVES, J.L.M.; STAPE, J.L. (Ed.). **Conservação e cultivo de solos para plantações florestais**. Piracicaba: IPEF, 2002. cap.1, p.3-45.

GONZÁLEZ, R.E. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium***. 2002. 93p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

HENRY, Y.; VAIN, P.; BUYSER de, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, Netherlands, v.79, n.1/2, p.45-58, 1994.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J-N.; BOUDET, A.M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Washington, v.161, n.4, p.645-653, Sept. 2001.

HEWELT, A.; PRINSEN, E.; THOMAS, M.; VAN ONCKELEN, H.; MEINS, F. Ectopic expression of maize *knott1* results in the cytokinin-autotrophic growth of cultured tobacco tissues. **Planta**, Berlin, v.210, n.6, p.884-889, May. 2000.

HICKS, G.S. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. **The Botanical Review**, Lawrence, v.46, n.1, p.1-23, Jan-March. 1980.

HICKS, G.S. Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. **in vitro Cellular Development Biology–Plant**, Gaithersburg, v. 30, p.10-15. Jan. 1994.

HIGASHI, E.D. **Diagnose de deficiência de nutrientes minerais em três híbridos de *Eucalyptus grandis* spp. Cultivados *in vitro***. 1996. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

JACOBS, W.P. The role of auxin in differentiation of xylem around a wound. **American Journal of Botany**, New York, v.39, n.5 p.301-309, May. 1952.

KAGEYAMA, P.Y.; KIKUTI, P. Comparison between clones and open-pollinated progenies originating from a population of *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden in Brazil. In **BRREDING TROPICAL TREES: POPULATION ESTRUTURE AND GENETIC IMPROVEMENT ATRATEGIES IN CLONAL AND SEEDLING FORESTRY**. Proceedings, Pattaya, Thailand, 1981. Oxford Forestry Institute; Winrock International, 1981. p.227-235.

KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R. Variação genética em progênes de uma população de *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden. **IPEF**, Piracicaba, n.24, p.9-26, abr. 1983.

KARNOVSKI, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, n.1, p.137-138, Oct. 1965.

KIELLY, G.A.; BOWLEY, S.R. Quantitative genetic analysis of *in vitro* callus proliferation in alfalfa. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.77, n.2, p.225-229, April. 1997.

LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**, Würzburg, v.13, p.473-476, May. 1994.

LIU, C.M.; XU, Z.H.; CHUA, N.H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **The Plant Cell**, Stanford, v.5, n.6, p.621-630, June. 1993.

MAHESWARAN, G.; WILLIAMS, E.G. Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*. **Annals of Botany**, Oxford, v.56, n.5, p.619-630, Nov.1985.

MALGORZATA, D.G. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration whit particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.43, n.1, p.27-47, May. 2004.

MCDANIEL, C.N.; SINGER,S.R.; SMITH, S.M.E. Developmental states associated with the floral transition. **Developmental Biology**, New York, v.153, n.1, p.59-69, Sept. 1992.

MENDES-DA GLÓRIA, J.F. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* visando antecipação de florescimento**. 2004. 92p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MORAES, M.L.T. de. **Variação genética da densidade básica da madeira em progênes de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e suas relações com as características de crescimento**. 1987. 115p. Dissertação (Mestrado em ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

MORI, E.S. **Variabilidade genética isoenzimática em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção**. 1993. 112 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

MROGINSKI, L.A.; KARTHA, K.K. Tissue culture of legumes for crop improvement. **Plant Breeding Review**, v.2, p.215-264, 1984.

MURALIDHARAN E.M.; MASCARENHAS A.F. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports** New York, v.6, n.3, p.256-259, June 1987.

NESTARES, G.; ZORZOLI, R.; MROGINSKI, L.; PICARD, L. Heritability of *in vitro* plant regeneration capacity in sunflower. **Plant Breeding**, Berlin, v.121, n.4, p.366-368, Aug. 2002.

NEWBIGIN, E.; SMYTH, D.R.; CLARKE, A.E. Understanding and controlling plant development. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.13, n.9, p.338-343, Sep. 1995.

NUGENT, G; CHANDLER, S.F.; WHITEMAN, F.; STEVENSON, T.F. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands v.67, n.1, p.85-88, Oct. 2001.

OSÓRIO, L.F.; WHITE, T.L.; HUBER D.A. Age trends of heritabilities and genotype-by-environment interactions for growth and wood density from clonal trials of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Silvae Genética**, Frankfurt, v.50, n.1. p.30-37, Mai. 2001.

PAULA, R.C. DE; GONÇALVES BORGES, R. DE C.; BARROS DE, N. F.; PIRES, I.E.; CRUZ D. Estimates of genetic parameters in half-sibs of *Eucalyptus camaldulensis* Denh. II. Nutrient Utilization. In: CHANDLER, D.; HENSON R. (Ed). **Efficiency Brazilian experiences in the production of eucalyptus for energy**. Morrilton:Winrock International, 1998. p.13-23.

PARK, Y.S.; POND, S.E.; BONGA, J.M. Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea galuca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.86, p. 427-436, Oct. 1993.

PERES E.P.L. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**, n.25, p.44-48. março/abril. 2002.

PÉREZ-TORNERO, O.; EGEA, J. VANOOSTENDE, A.; BURGOS, L. Assessment of factor affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. **Plant Science**, Washington, v.158, n.1/2, p.61-70, Sept. 2000.

PHILLIPS, G.C. Invited review: *in vitro* morphogenesis in plants – recent advances. **In vitro Cellular Development Biology–Plant**, Gaithersburg, v.10, n.4, p.342-345, July/Aug. 2004.

PINTO, G.; SANTOS, C.; NEVES, L.; ARAÚJO C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, New york, v.21, n.3, p.208-213, Oct. 2002.

PUGA, N.T.; NASS, L.L.; de AZEVEDO, J.L. **Glossário de biotecnologia vegetal**, São Paulo:Manole, 1991. 82 p.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In vitro Cellular Development Biology–Plant**, Gaithersburg, v.38, n.2, p.116-124, april. 2002.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Cytokinin-induced abnormal shoot oeganogenesis is associated with elevated *Knotted1*-type homeobox gene expression in tobacco. **Plant Cell Reports**, New York, v.22, n.12 ,p.919-924, July. 2004.

ROSADO, M. A. **Critério de avaliação da eficiência nutricional para seleção em famílias de meios-irmãos e clones de eucalipto**. 1999. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

RUAUD, J.N.; LAWRENCE, N.; PEPPER, S.; POTTS, B.M.; BORRALHO, N.M.G. Genetic variation of *in vitro* rooting ability with time in *Eucalyptus globulus*. **Silvae Genética**, Frankfurt, v.48, n.1, p.4-7, May 1999.

SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E.; OLMOS, E. Hyperhidricity in micripropagated carnation shoot: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v.120, n.1, p.152-161, Jan. 2004.

SAKAI, W.S. Simple method for differential attaining of parafilm embedded plant material using toluidine blue 01. **Stain Technology**, Baltimore, v.48, n.1, p.247-249, 1973.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**, 4rd ed. San Francisco: Wadsworth Publ. 1991. 682p.

SARTORETTO, L.M.; BARRUETO-CID, L.P.; BRASILEIRO, A.C.M. Biolistic transformation of *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* callus. **Functional Plant Biology**, Victoria, v.29, n.8, p.917-924, 2002.

SARWAR, M., SKIRVIN, R.M. Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'McIntosh' apple (*Malus X domestica* Borkh.) *in vitro*. **Scietia Horticulturae**, Amsterdam, v.68, n. 1/4, p. 95-100, March. 1997.

SAS Institute Inc. **The SAS System, Release 8.2**, SAS Institute Inc, Cary: NC, 1999.

SHARMA, S.K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**. New York, v.19, n.5, p.511-518, April. 2000.

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

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**. Cambridge, v.11, p.118-140, 1957.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 2nd ed. **Analysis of variance II: Multiway classifications, The randomized complete block design: more than one observation per treatment per block**. Tokyo McGRAW-HILL KOGAKUSHA (ed.) , 1980. chap. 9, p.195-238.

STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, New York, v.45,n.10, p.705-708, Dec. 1958.

SUBBAIAH, M.M.; MINOCHA, S.C. Shoot regeneration from stem callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, Würzburg, v.9, n.7, p.370-373, Nov. 1990.

SUNG Z.R.; SMITH J.M.; CHOI J.H.; KRAUS M.; BORKIRD C.; LIU L.S. Gene expression in embryogenesis. **HortScience** St. Joseph, v.23, n.3, p.513-515, June 1988.

TANG, W.; OUYANG, F. Plant regeneration via organogenesis from six families of loblolly pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.58, n.3, p.223-226, Jan. 1999.

TANG, W.; WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Genotypic control of high-frequency adventitious shoot regeneration via somatic organogenesis in loblolly pine. **Plant Science**, Washington, v.161, n.2, p.267-272, July, 2001.

TIBOK, A.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, Washington, v.110, n.1, p.139-145, Sept. 1995.

TRAN THANH VAN; M. Direct Flower Neof ormation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, Berlin, v.115, p.87-92, 1973.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 1992, cap. 3, p. 83-232: Componentes da variação fenotípica. Análise em um ambiente.

VON ARNOLD, S.; SABALA; I.; BOZHKO V, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.69, n.3, p.233-249, June. 2002.

WARRAG, E.; LESNEY, M.S.; ROCKWOOD, D.J. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**, Würzburg, v.9, n.10, p.586-589, Feb. 1991.

WATT M.P., F. BLAKEWAY, C.F. CRESSWELL AND B. HERMAN. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **Suid Afrikaanse Bosboutydskrif**, Menlo Park, v.157, p.59-65 June 1991.

ZAFFARI, G. R.; PERES, L. E. P.; SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B. Off-type micropropagated banana plants: endogenous levels of auxin, cytokinins and IAA-oxidase. **Acta Horticulturae**, Brugge, v.520, p.219-227, Jan. 2000.

ZHANG, S.; LEMAUX, P.G. Molecular analysis of *in vitro* Organogenesis. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.23, n.4, p.325-335, July-Aug. 2004.

ZIMMERMAN J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, Stanford, v.5, n.10, p.1411-1423, Oct. 1993.



ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In: AITKEN-CHRITIE, J.; KOZAI, T.; LILA SMITH, M. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 493-516.