

TATIANA MAZON CÉZAR

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE PEROBA-ROSA
(*Aspidosperma polyneuron* MÜLL. ARG.).

CURITIBA

2007

TATIANA MAZON CÉZAR

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE PEROBA-ROSA
(*Aspidosperma polyneuron* MÜLL. ARG.).

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Botânica (BB033), como requisito parcial à conclusão do curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana L. F. Ribas

CURITIBA

2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmãos pelo apoio e compreensão.

À Manoela W. Cardoso, Ariane Portela, Waleska Dembiski e Fernanda Castelhana de Souza pela amizade e pela força.

À prof^a Luciana Lopes Fortes Ribas pela oportunidade e pela orientação.

A todos os colegas do Laboratório de Micropropagação e Cultura de Tecidos Vegetais da UFPR, em especial, Pamela Harada, Luciana Pelegrini e Diogo Lacerda, pela amizade e auxílio.

À Fundação Araucária, pelo financiamento do projeto.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para tornar este trabalho possível.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A PEROBA-ROSA (<i>Aspidosperma polyneuron</i> Müll. Arg.).....	4
3.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	5
3.2.1 Fatores que influenciam a embriogênese somática <i>in vitro</i>.....	7
3.2.1.1 Escolha do explante.....	7
3.2.1.2 Condições de cultivo e Composição do Meio de cultura.....	7
3.2.2 Etapas da embriogênese e combinações de reguladores vegetais.....	8
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.1 COLETA DE FRUTOS, OBTENÇÃO E DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES...	10
4.2 FONTES DE EXPLANTES.....	10
4.3 MEIO DE CULTURA.....	10
4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	11
4.5 INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS.....	11
4.5.1 Experimento 1.....	11
4.5.2 Experimento 2.....	11
4.5.3 Experimento 3.....	12
4.6 MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	13
4.7 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO E AVALIAÇÕES.....	13
5 RESULTADOS.....	15
5.1 EXPERIMENTO 1.....	15
5.1.1 Indução de calos.....	15
5.1.2 Manutenção dos calos e formação de massa embriogênica.....	16
5.2 EXPERIMENTO 2.....	19
5.2.1 Indução de calos.....	19
5.2.2 Manutenção dos calos e formação de massas embriogênicas.....	21
5.3 EXPERIMENTO 3.....	23
5.3.1 Indução de calos.....	23
5.3.2 Manutenção dos calos e formação de massas embriogênicas.....	24
5.3.3 Manutenção de calos e de massas embriogênicas e maturação dos embriões somáticos.....	26
6 DISCUSSÃO.....	28
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	31
FIGURAS.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ANEXOS.....	43

LISTA DE FIGURAS

- 1 FRUTOS E SEMENTES DE *Aspidosperma polyneuron* COLETADOS NO INSTITUTO FLORESTAL DE SÃO PAULO. **1A** – FRUTOS IMATUROS DA PRIMEIRA COLETA EM 11/07/2006; **1B** – SEMENTES NO INÍCIO DE SUA FORMAÇÃO OBTIDAS DA PRIMEIRA COLETA; **1C** – SEMENTES MAIS DESENVOLVIDAS DA PRIMEIRA COLETA; **1D** - FRUTOS IMATUROS DA SEGUNDA COLETA EM 23/10/2006; **1E** – SEMENTES MAIS IMATURAS E MAIS DESENVOLVIDAS DA SEGUNDA COLETA.....33

- 2 CALOS DE *Aspidosperma polyneuron* FORMADOS EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS (EXPERIMENTO 1). **2A** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 5 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN, APÓS QUATRO SEMANAS; **2B** E **2C**– CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 5 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN, APÓS QUATRO SEMANAS (2B) E OITO SEMANAS (2C); **2D** E **2E** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 5 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE CIN, APÓS 4 SEMANAS (2D) E OITO SEMANAS (2E); **2F** E **2G** - CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN, APÓS 4 SEMANAS (2F) E OITO SEMANAS (2G); **2H** E **2I**- CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE CIN, APÓS 4 SEMANAS (2H) E OITO SEMANAS (2I).....34

- 3 MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE *Aspidosperma polyneuron* FORMADAS EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS (EXPERIMENTO 1). **3A**-MASSA EMBRIOGÊNICA SE DESENVOLVENDO NO COTILÉDONE DO EMBRIÃO, APÓS QUATRO SEMANAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA, COM 0,5 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN; **3B** – MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA NO EMBRIÃO APÓS QUATRO SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO PARA MEIO DE CULTURA COM 0,5 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN; **3C** E **3D** - MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA NO EMBRIÃO APÓS 10 SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA COM 0,5 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN; **3E** E **3F** - MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA NO EMBRIÃO APÓS 10 SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA COM 1,0 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN; **3G** E **3H** – MASSA EMBRIOGÊNICA SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA COM 2,5 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE CIN APÓS QUATRO SEMANAS DO TERCEIRO SUBCULTIVO; **3I** - MASSA EMBRIOGÊNICA SE DESNVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA COM 2,5 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE CIN, APÓS OITO SEMANAS DO TERCEIRO SUBCULTIVO.....35

- 4 CALOS DE *Aspidosperma polyneuron* FORMADOS EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS (EXPERIMENTO 2). **4 A** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 5 μM DE,4-D E 0,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS; **4B** E **4C** – CALO FORMADO SOBRE EMBRIÃO COM GRANDE DESENVOLVIMENTO DO COTILÉDONE EM MEIO DE CULTURA COM 5 μM DE,4-D E 0,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS (4B) E OITO SEMANAS (4C); **4D** E **4E** – CALO FORMADO EM TODO EMBRIÃO EM MEIO DE CULTURA COM 5 μM DE,4-D E 0,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS (4D) E OITO SEMANAS (4E); **4F** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 5 μM DE,4-D E 2,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS; **4G** - CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS; **4 H** - CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS; **4I** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE BAP, APÓS OITO SEMANAS.....36

5 MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE *Aspidosperma polyneuron* FORMADAS EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS (EXPERIMENTO 2). **5A** E **5D** – MASSA FORMADA EM MEIO DE CULTURA COM 0,5 µM DE 2,4-D E 2,5 µM DE BAP, APÓS 6 SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO (5A) E OITO SEMANAS (5D); **5B**- MASSA FORMADA EM MEIO DE CULTURA COM 0,5 µM DE 2,4-D E 2,5 µM DE BAP, APÓS OITO SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO; **5C**- MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA EM MEIO COM 1 µM DE 2,4-D E 2,5 µM DE BAP, APÓS OITO SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO; **5E** E **5F** – MASSA EMBRIOGÊNICA SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA COM 2,5 µM DE 2,4-D E 2,5 µM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS DO TERCEIRO SUBCULTIVO.....37

6 CALOS DE *Aspidosperma polyneuron* FORMADOS EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS, COM 0,5 GL⁻¹ DE CASEÍNA HIDROLISADA E GLUTAMINA (EXPERIMENTO 3). **6A** - CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 5 µM DE 2,4-D, 2,5 µM DE CIN E 2 GL⁻¹ DE GELRITE, APÓS SEIS SEMANAS; **6B** - CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10 µM DE 2,4-D, 2,5 µM DE CIN E 2 GL⁻¹ DE GELRITE, APÓS SEIS SEMANAS; **6C** - CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 5 µM DE 2,4-D, 2,5 µM DE CIN E 4 GL⁻¹ DE ÁGAR, APÓS SEIS SEMANAS; **6D** - CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10 µM DE 2,4-D, 2,5 µM DE CIN E 4 GL⁻¹ DE ÁGAR, APÓS SEIS SEMANAS; **6E** - CALO COM MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA EM MEIO COM 1,25 µM DE 2,4-D, 2,5 µM DE CIN E 2 GL⁻¹ DE GELRITE, APÓS SEIS SEMANAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO; **6F** - CALO COM MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA EM MEIO COM 1,25 µM DE 2,4-D, 2,5 µM DE CIN E 2 GL⁻¹ DE GELRITE, APÓS DEZ SEMANAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO; **6G** - CALO COM MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA EM MEIO COM 2,5 µM DE 2,4-D, 2,5 µM DE CIN E 2 GL⁻¹ DE GELRITE, APÓS ONZE SEMANAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO; **6H**- REGIÃO DO COTILÉDONE EM MEIO DE CULTURA COM 1,25 µM DE 2,4-D, 2,5 µM DE CIN E 4 GL⁻¹ DE ÁGAR, APÓS SEIS SEMANAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO; **6I** – OUTRA PARTE DO EMBRIÃO (6H) COM O EIXO EMBRIONÁRIO SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA COM 1,25 µM DE 2,4-D, 2,5 µM DE CIN E 4 GL⁻¹ DE ÁGAR, APÓS SEIS SEMANAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO.....38

7 MASSAS EMBRIOGÊNICAS E EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Aspidosperma polyneuron*, OBTIDOS EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS, COM 0,5 GL⁻¹ DE CASEÍNA HIDROLISADA E GLUTAMINA (EXPERIMENTO 3). **7A** – EMBRIÕES GLOBULARES FORMADOS APÓS 12 SEMANAS DE PERMANÊNCIA EM MEIO DE CULTURA COM 2 GL⁻¹ DE GELRITE, 5 µM DE 2,4-D E 2,5 µM DE CIN; **7B**- MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA EM MEIO DE CULTURA COM 4 GL⁻¹ DE ÁGAR, 10 µM DE 2,4-D E 2,5 µM DE CIN, APÓS 12 SEMANAS; **7C**- EMBRIÕES GLOBULARES FORMADOS NA REGIÃO COTILEDONAR, APÓS CINCO SEMANAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA COM 2 GL⁻¹ DE GELRITE, 1,25 µM DE 2,4-D E 2,5 µM DE CIN; **7D**- EMBRIÕES GLOBULARES FORMADOS APÓS 10 SEMANAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA COM 2 GL⁻¹ DE GELRITE, 1,25 µM DE 2,4-D E 2,5 µM DE CIN; **7E** – MASSA EMBRIOGÊNICA SE DESENVOLVENDO APÓS TRÊS SEMANAS DA TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE CULTURA COM 10 µM DE 2-IP E 0,5 µM DE ANA; **7F** – EMBRIÕES SOMÁTICOS NO ESTÁDIO TORPEDO SE DESENVOLVENDO APÓS TRÊS SEMANAS DA TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE CULTURA COM 10 µM DE 2-IP E 0,5 µM DE ANA; **7G** E **7H** – EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES E CORDIFORMES SE DESENVOLVENDO SOBRE MASSA EMBRIOGÊNICA, APÓS TRÊS SEMANAS DA TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE CULTURA COM 10 µM DE 2-IP E 0,5 µM DE ANA.....39

LISTA DE TABELAS

1	RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> OBTIDAS EM MEIO DE CULTURA WPM, COM COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS, APÓS QUATRO E OITO SEMANAS.....	15
2	FORMAÇÃO DE CALOS E MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> , EM MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM UM DÉCIMO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D UTILIZADA PARA INDUÇÃO (PRIMEIRO SUBCULTIVO), APÓS SEIS SEMANAS.....	17
3	MANUTENÇÃO E FORMAÇÃO DE CALOS E MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> , APÓS QUATRO, OITO E DOZE SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO PARA MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM UM DÉCIMO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D UTILIZADA PARA INDUÇÃO.....	18
4	RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> OBTIDAS APÓS QUATRO, OITO E DOZE SEMANAS DO TERCEIRO SUBCULTIVO, COM AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D PARA 2,5µM.....	19
5	RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> OBTIDAS EM MEIO DE CULTURA WPM, COM COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS, APÓS QUATRO E OITO SEMANAS DE INDUÇÃO.....	20
6	FORMAÇÃO DE CALOS E MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> , EM MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM UM DÉCIMO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D UTILIZADA PARA INDUÇÃO (PRIMEIRO SUBCULTIVO), APÓS DUAS E SEIS SEMANAS.....	21
7	MANUTENÇÃO E FORMAÇÃO DE CALOS E MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> , APÓS QUATRO, OITO E DOZE SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO PARA MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM UM DÉCIMO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D UTILIZADA PARA INDUÇÃO.....	22
8	RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> OBTIDAS APÓS QUATRO, OITO E DOZE SEMANAS DO TERCEIRO SUBCULTIVO, COM AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D PARA 2,5µM.....	23
9	RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> OBTIDAS EM MEIO DE CULTURA WPM, COM COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS, APÓS QUATRO, OITO E DOZE SEMANAS DE INDUÇÃO.....	24
10	FORMAÇÃO DE CALOS E MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> , EM MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM UM QUARTO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D UTILIZADA PARA INDUÇÃO (PRIMEIRO SUBCULTIVO), APÓS QUATRO, OITO E DOZE SEMANAS.....	25
11	MANUTENÇÃO DE CALOS, MASSAS EMBRIOGÊNICAS E MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Aspidosperma polyneuron</i> EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM REGULADORES VEGETAIS APÓS QUATRO SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2-iP – N⁶-(2-isopentenil)adenina
AIA – ácido indol-acético
ANA – ácido naftalenoacético
BAP – 6-benzilaminopurina
CIN – cinetina (6-furfurilaminopurina)
DAP – diâmetro à altura do peito
MS – Murashige e Skoog, 1962
TDZ – thidiazuron (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-tiouréia)
WPM – Woody Plant Medium - Lloyd e McCown, 1980

RESUMO

A peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*) é uma espécie florestal a qual, devido à qualidade de sua madeira, foi amplamente utilizada na construção civil e na indústria de móveis. Atualmente, a espécie se encontra ameaçada de extinção e necessitando com urgência de programas de conservação. Sua propagação por métodos convencionais é difícil devido a sua produção irregular de frutos (a cada 2-4 anos) e difícil enraizamento em estacas. A embriogênese somática é uma técnica de cultivo *in vitro* que permite a propagação massal de plantas. O objetivo deste trabalho foi contribuir para a otimização dos protocolos de embriogênese somática de peroba-rosa a partir de embriões zigóticos imaturos, testando-se diferentes concentrações de reguladores vegetais e diferentes agentes geleificantes. Para a indução da embriogênese somática, foram testadas as combinações de 5,0 μM ou 10,0 μM de 2,4-D com 0,5 μM ou 2,5 μM de CIN ou de BAP, em meio de cultura WPM semi-sólido (4 gL^{-1} de ágar Micromed[®] ou 2 gL^{-1} de gelrite), acrescido ou não de caseína hidrolisada e L-glutamina (0,5 gL^{-1} cada). Após 10 a 12 semanas, as culturas foram subcultivadas para meios com 1/4 ou 1/10 da concentração de 2,4-D. A formação de massas embriogênicas foi observada nos embriões mais imaturos, após o subcultivo para meio de cultura com redução da concentração de 2,4-D. A embriogênese somática direta e indireta (com maior frequência) foi obtida a partir de embriões bem imaturos após 12 semanas de indução em meio WPM, acrescido de gelrite (2 gL^{-1}), caseína hidrolisada e L-glutamina, com 5,0 μM de 2,4-D e 2,5 μM de CIN, seguido de transferência para meio com 1,25 μM de 2,4-D e 2,5 μM de CIN. O meio de maturação com 10,0 μM de 2-iP e 0,5 μM de ANA têm permitido a formação de novos embriões somáticos e o desenvolvimento dos embriões para os estádios cordiforme e torpedo. Para o estabelecimento de um protocolo de embriogênese somática há necessidade de mais estudos para as etapas de maturação e conversão de embriões somáticos em plantas.

Palavras-chave: agente geleificante; micropropagação; espécie florestal

1 INTRODUÇÃO

A peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*), pertencente à família Apocynaceae, é uma espécie perenifólia característica da floresta latifoliada semidecídua da bacia do Rio Paraná e da Mata Pluvial Atlântica (LORENZI, 2002). A espécie é secundária tardia (DIAS *et al.*, 1998; CARVALHO, 1994) e sua distribuição abrange os Estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e Rondônia (LORENZI, 2002; CARVALHO, 1994). No Estado do Paraná, a espécie é dominante nas matas pluvio-tropicais dos planaltos do interior (MAACK, 1981). Apresenta madeira de excelente qualidade, muito usada na indústria de móveis, carpintaria, construção naval e construção civil (CARVALHO, 1994) na qual era principalmente empregada em estruturas de telhado (FERREIRA, 2003).

Até meados da década de 1970, a peroba-rosa e o pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*) foram as principais espécies exploradas para a construção civil nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil (ZENID, 2003). A peroba-rosa é classificada como rara e ameaçada de extinção de acordo com a lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção do Estado do Paraná (HATSCHBACH e ZILLER, 1995).

A espécie é recomendada para reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 2002) e para recomposição de mata-ciliar em locais com ausência de inundação (CARVALHO, 1994), entretanto apresenta dificuldades de propagação, por possuir frutificação irregular, com produção de grandes quantidades de sementes em intervalos de dois a quatro anos, germinação irregular, coleta difícil dos frutos devido à altura das árvores e difícil enraizamento pela propagação via estacas (CARVALHO, 1994).

A micropropagação é uma alternativa para propagar plantas de multiplicação lenta ou que não podem ser propagadas vegetativamente de outras formas (HARTMANN *et al.*, 2002). Ela permite a propagação massal de plantas em um pequeno espaço físico e em condições controladas.

Uma das técnicas de micropropagação é a embriogênese somática, a qual permite que as células somáticas de um explante sejam induzidas a uma

desdiferenciação a um estado embriogênico, a partir do qual podem reconstituir os estádios de desenvolvimento de um embrião zigótico – estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA *et al.*, 1999).

Existem dois padrões de embriogênese somática, o direto, no qual os embriões somáticos originam-se diretamente do tecido do explante, e o indireto, no qual há a formação intermediária de calo, sobre o qual posteriormente se formam os embriões somáticos (GUERRA *et al.*, 1999).

A embriogênese somática é possível devido à totipotencialidade das células vegetais e à reprogramação genética promovida na maioria das espécies por uma alta concentração de auxina, geralmente ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), no meio de cultura (GEORGE, 1996; HARTMANN *et al.*, 2002; PHILLIPS *et al.*, 1995). Na maioria das culturas de células de dicotiledôneas, também são necessárias baixas concentrações de citocinina, que tendem a aumentar a taxa de crescimento do calo embriogênico (GEORGE, 1996).

Uma vez obtidos os embriões somáticos, é necessária a transferência para meios com baixas concentrações de auxina, ou mesmo sem reguladores vegetais, visto que a alta concentração de auxina utilizada na indução geralmente é inibitória para o desenvolvimento dos embriões somáticos para estádios mais avançados (PHILLIPS *et al.*, 1995).

Todas as etapas da embriogênese somática são significativamente afetadas por modificações dos componentes do meio e das condições de cultura. Os fatores mais importantes são: fotoperíodo, concentrações e constituintes do meio básico (principalmente, sacarose e nitrogênio), agente geleificante, reguladores de crescimento e pH (GEORGE, 1996; TAUTORUS *et al.*, 1991). Outros fatores que influenciam a embriogênese são o estado fisiológico do explante e seu estado de juvenildade e as diferenças genotípicas entre cultivares (GEORGE, 1996).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Contribuir para os estudos e a otimização do protocolo de embriogênese somática de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar diferentes concentrações de reguladores vegetais para a indução de embriões somáticos;
- Testar combinações de reguladores vegetais que permitam a manutenção e a multiplicação de massas embriogênicas;
- Testar o melhor agente geleificante, ágar ou gelrite, para a indução de embriões somáticos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A PEROBA-ROSA (*Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg.)

A peroba-rosa é uma árvore pertencente à família Apocynaceae, perenifólia, atingindo geralmente 15 a 25 m de altura e entre 50 a 100 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), podendo atingir até 45 m de altura e 200 cm de DAP (CARVALHO, 1994).

Possui tronco cilíndrico, reto ou levemente tortuoso, com coloração externa castanha-grisácea e interna em tom róseo, de onde vem o nome comum (CARVALHO, 1994). Sua copa é alta, densa e corimbiforme, seu fruto é seco e deiscente, em formato elipsóide e achatado, densamente coberto por lenticelas, medindo de 2,5 a 6 cm de comprimento por 1 a 2 cm de largura (CARVALHO, 1994). O fruto possui dois ovários, cada qual contendo de cinco a sete óvulos (SOUZA e MOSCHETA, 1992). A semente é elíptica e alada, medindo de 2 a 4 cm de comprimento por 10 mm de largura, e apresenta poliembrionia, havendo geralmente entre 3 a 6 embriões por semente e observando-se comumente um embrião mais desenvolvido e outros menores, que mostram, além da diferença em tamanho, estádios de desenvolvimento variável (SOUZA e MOSCHETA, 1992). A poliembrionia observada nas sementes de peroba-rosa não é relatada na literatura para outras espécies do gênero *Aspidosperma*, ou mesmo da família Apocynaceae (SOUZA e MOSCHETA, 1992).

A peroba-rosa é uma espécie umbrófila de sucessão tardia, não ocorrendo em pastos ou terrenos abertos (CARVALHO, 1994; DIAS *et al.*, 1998). A espécie é característica da Floresta Estacional Semidecidual, principalmente do norte e oeste paranaenses (CARVALHO, 1994), na região dos solos de terra-roxa (SOUZA e MOSCHETA, 1992), onde desempenhava papel relevante chegando, em alguns locais, a representar de 60% a 80% da cobertura do estrato emergente (CARVALHO, 1994).

A peroba-rosa também é encontrada na Floresta Estacional Decidual e, em menor escala, na Floresta Ombrófila Mista e na Amazônia e, esporadicamente, no Pantanal (CARVALHO, 1994), não ocorrendo nos cerrados, nem nos cerradões (SOUZA e MOSCHETA, 1992).

Para Torezan *et al.* (2005), a peroba-rosa parece ser uma espécie-chave para a conservação da Floresta Estacional Semidecidual por corresponder a mais de 40% da biomassa do estrato emergente. Espécies-chave são espécies cujas informações acerca de sua diversidade genética podem ser extrapoladas para toda a região onde se localizam, fornecendo, assim, um método para estabelecer estratégias de conservação de hábitat fragmentados.

Devido à qualidade de sua madeira, com grande resistência mecânica e à decomposição, a peroba-rosa foi amplamente utilizada na construção civil e na indústria de móveis até meados da década de 1970, para a produção de vigas, caibros, dormentes, cruzetas, assoalhos, marcos de portas e janelas, venezianas, portas, móveis pesados e, principalmente, em estruturas de telhado (ZENID, 2003; FERREIRA, 2003; CARVALHO, 1994). Pelo fato de sua madeira ser uma das que menos oxidam em contato com metais, a peroba-rosa também tem uso na construção naval (CARVALHO, 1994).

Segundo a lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção no Estado do Paraná, a peroba-rosa é classificada como espécie rara e ameaçada de extinção (HATSCHBACH e ZILLER, 1995). É também uma espécie que apresenta dificuldades de propagação, por possuir frutificação irregular, freqüentemente havendo anos sem frutificação, e com grande produção de frutos apenas em intervalos que variam entre dois a quatro anos (CARVALHO, 1994). A germinação das sementes é irregular, variando entre 35 a 70%, e a propagação via estaquia apresenta dificuldade de enraizamento (CARVALHO, 1994).

3.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática consiste na formação de embriões a partir de células somáticas, diferentemente da formação dos embriões zigóticos, formados na fusão dos gametas (GEORGE, 1996; HARTMANN *et al.*, 2002).

A embriogênese somática pode ocorrer naturalmente, como por exemplo nos embriões apomíticos de *Citrus* (GUERRA *et al.*, 1999), e nas margens de folhas de plantas como *Kalanchoe*, *Bryophyllum* e *Malaxis* (FEHÉR, 2005) ou pode ser induzida em culturas *in vitro*.

Durante seu desenvolvimento, o embrião somático apresenta muitas semelhanças morfológicas com o embrião zigótico, pois ambos apresentam uma diferenciação inicial em estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular, e passam por estádios de desenvolvimento pró-embriionários e pelos embriionários propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA *et al.*, 1999).

Na embriogênese somática *in vitro* são observados dois padrões, um direto e o outro indireto. Na embriogênese direta, os embriões somáticos se originam diretamente sobre o explante, a partir de células pré-determinadas para a rota embriogenética. Estas células retêm algumas das propriedades das células meristemáticas parentais, das quais as células do explante derivaram. Por isso, geralmente o padrão direto ocorre em explantes mais juvenis, pois supõe-se que estes possuam uma maior proporção de células pré-determinadas para a embriogênese do que tecidos mais maduros. Na embriogênese indireta, que geralmente ocorre em explantes mais maduros, há a necessidade de uma etapa intermediária de desdiferenciação do tecido do explante, para que as células adquiram competência para serem reprogramadas geneticamente para seguir a rota embriogenética, através de sinais, como por exemplo reguladores vegetais (GUERRA *et al.*, 1999).

Comparada com outras técnicas de micropropagação, a embriogênese somática ainda apresenta algumas limitações para a propagação clonal de espécies lenhosas, como dificuldades na indução (para alguns genótipos), no desenvolvimento dos embriões somáticos e na conversão destes em plântulas viáveis (RIBAS, 1999). Porém, a embriogênese apresenta um potencial de produção de mudas em uma escala muito maior do que as outras técnicas de propagação (GEORGE, 1993). Além disso, a formação de uma estrutura bipolar na embriogênese elimina etapas que são separadas em outras técnicas (formação de brotações adventícias e enraizamento), o que pode reduzir os custos de produção. Outra vantagem é que os embriões somáticos podem ser encapsulados, geralmente com alginato de sódio, formando sementes artificiais, que podem ser plantadas diretamente ao solo, eliminando-se assim, os custos dos processos de aclimatização necessários para a adaptação *ex vitro* das mudas obtidas em outras técnicas de micropropagação (GUERRA *et al.*, 1999).

3.2.1 Fatores que influenciam a embriogênese somática *in vitro*

3.2.1.1 Escolha do explante

Em geral, quase todas as partes da planta podem ser usadas na indução da embriogênese somática: ápices caulinares, hipocótilos, discos foliares, segmentos foliares, inflorescências e raízes, dentre outros (GUERRA *et al.*, 1999).

Para a indução e estudo da embriogênese somática, o explante mais comumente utilizado é o embrião zigótico imaturo. Esse tecido já é embriogenético por natureza e aparentemente requer menos suplementos no meio de cultura do que outros tecidos para a ocorrência de uma resposta de embriogênese somática (FINER, 1994). Entretanto, é desejável, sempre que possível, utilizar explantes mais maduros, dos quais são conhecidas as características da planta doadora, uma vez que nos embriões zigóticos o valor genético da futura planta é desconhecido (CARVALHO e VIDAL, 2003).

Um aspecto que dificulta a utilização de explantes adultos é que estes freqüentemente produzem mais substâncias fenólicas do que explantes juvenis (GEORGE, 1993). Estas substâncias geram um escurecimento do meio e do explante e afetam o metabolismo de vários modos, geralmente inibindo os processos de embriogênese (BONGA e Von ADERKAS, 1992). Os exsudatos fenólicos causam injúrias aos tecidos, as quais secretam mais exsudatos e, conseqüentemente, há aumento do escurecimento das culturas. O método mais comum para evitar o escurecimento são os subcultivos freqüentes, nos quais remove-se as partes necrosadas dos tecidos para que elas não afetem as partes saudáveis (BONGA e Von ADERKAS, 1992).

Além da questão da juvenilidade do explante, outro fator que influencia a embriogênese é o genótipo do explante. Freqüentemente são observadas diferenças nas respostas morfogenéticas de diferentes cultivares de uma mesma espécie (HARTMANN *et al.*, 2002).

3.2.1.2 Condições de cultivo e Composição do Meio de cultura

Fatores como o pH do meio de cultura, fotoperíodo e agente geleificante do meio influenciam nas respostas de embriogênese somática (PHILLIPS *et al.*, 1995).

Diferentes agentes geleificantes, em diferentes concentrações, influenciam na difusão dos nutrientes do meio e dos exsudatos produzidos pelo explante. Também apresentam diferenças quanto à presença de impurezas orgânicas e inorgânicas que podem interferir no desenvolvimento do explante (GEORGE, 1993).

Quanto à composição salina dos meios de cultura, formulações inadequadas contribuem para o escurecimento do meio. Quando o balanço dos sais é apropriado, diminui-se o estresse do explante, diminuindo também a produção de compostos fenólicos (PREECE, 1995). Em geral, menores concentrações de sais contribuem para a diminuição da oxidação e do escurecimento do meio (PREECE, 1995).

Para muitas espécies lenhosas, o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) em suas concentrações totais de sais é inibitório para o crescimento organizado (BONGA e Von ADERKAS, 1992). Uma variação do meio MS com menores concentrações de sais e o meio WPM - "woody plant medium" (LLOYD e McCOWN, 1980), são bastante utilizados na propagação de plantas arbóreas e arbustivas (GEORGE, 1993).

Outras substâncias que influenciam na embriogênese e que podem ser adicionadas ao meio de cultura para otimizar o processo são vitaminas e aminoácidos, estes últimos, para suprir as necessidades de nitrogênio reduzido (GEORGE, 1993).

3.2.2 Etapas da embriogênese e combinações de reguladores vegetais

Geralmente são utilizados no mínimo duas formulações de meio de cultura diferentes na embriogênese somática. Estes meios de cultura freqüentemente diferem nas concentrações de reguladores vegetais, mas também podem diferir na formulação salina. Normalmente, o primeiro meio é otimizado para a etapa de indução da embriogênese somática, e o segundo meio para permitir o desenvolvimento dos embriões somáticos. Isto é necessário porque as condições que favorecem a iniciação da embriogênese geralmente inibem o desenvolvimento posterior dos embriões (PREECE, 1995; PHILLIPS *et al.*, 1995).

Na maioria dos modelos de embriogênese somática, as auxinas e dentre elas o ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D), são utilizadas na etapa de indução. As auxinas são consideradas as substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de desdiferenciação (modelos indiretos) e rediferenciação (modelos

diretos), através da alteração da determinação celular e da sensibilidade das células responsivas (GUERRA *et al.*, 1999).

Entretanto, altas concentrações de auxina e/ ou uma exposição muito prolongada a esse regulador, podem resultar na perda da capacidade embriogênica do tecido cultivado (GEORGE, 1993), sendo necessário estudar as concentrações e períodos de exposição à auxina adequados para a indução da embriogênese somática para cada espécie/ cultivar.

Para a maioria das dicotiledôneas, é necessária também a adição de uma citocinina (como por exemplo cinetina, benzilaminopurina, thiazuron, zeatina, dentre outras) no meio de cultura contendo auxina, para promover a proliferação do calo e a multiplicação das culturas (GEORGE, 1996). Para algumas espécies, porém, as citocininas são inibitórias à embriogênese; em outras, induzem a embriogênese sem estarem em combinação com auxinas (GEORGE, 1993).

Para a manutenção dos calos, geralmente se utiliza um meio muito similar ao da indução, porém com menor concentração de auxina (GEORGE, 1993).

Para a maturação dos embriões somáticos, é bastante freqüente a utilização de meio de cultura suplementado com ácido abscísico. Também é possível utilizar-se meio de cultura suplementado com auxina fraca, como o ácido indol acético (AIA) ou o ácido naftalenoacético (ANA), combinada com uma citocinina, como por exemplo a N⁶-(2-isopentenil)-adenina (2-iP) (GEORGE, 1993; RIBAS, 1999).

Segundo Preece (1995), a concentração de reguladores vegetais corrige, em parte, desbalanços nos nutrientes do meio de cultura, e o uso dos reguladores pode ser reduzido se os explantes forem cultivados em meio apropriado. Portanto, pode-se otimizar o processo da embriogênese pesquisando-se uma boa proporção entre sais e reguladores vegetais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DE FRUTOS, OBTENÇÃO E DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES

Foram realizadas duas coletas de frutos verdes no Instituto Florestal de São Paulo - SP, nos dias 11/07/2006 e 23/10/2006. Os frutos coletados mediam aproximadamente 3,5 cm de comprimento e entre 0,5 e 1,0 cm de diâmetro (FIGURAS 1A e 1D).

Com a abertura dos frutos imaturos, constatou-se que neles havia sementes imaturas recém-formadas (FIGURA 1B), com embriões de no máximo 0,5 cm de comprimento e 0,3 cm de largura, e sementes imaturas desenvolvidas com embriões de no máximo 1,5 cm de comprimento e 1,0 cm de largura (FIGURA 1C). As sementes imaturas recém-formadas continham apenas um embrião, enquanto que as sementes imaturas desenvolvidas eram poliembriônicas, com um embrião maior e outros menores.

A figura 1E apresenta sementes retiradas de frutos da segunda coleta, de coloração verde, e também com sementes mais imaturas e outras mais desenvolvidas.

As sementes foram submetidas a desinfestação com imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1,0%, acrescida de Tween[®] 20 a 0,1%, durante 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar, foram realizadas seis lavagens das sementes, com água destilada esterilizada, para remover os resíduos dos desinfestantes.

4.2 FONTES DE EXPLANTES

Embriões zigóticos imaturos foram individualizados das sementes poliembriônicas de peroba-rosa e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 ml de meio de cultura.

4.3 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado foi o WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) (ANEXO 1), de consistência semi-sólida obtida com o acréscimo de 4 gL⁻¹ de ágar Micromed[®] ou de 2 gL⁻¹ de gelrite.

O pH dos meios de cultura foi ajustado em 5,8 com NaOH e/ ou HCl 0,1 N antes da adição do agente geleificante e antes de serem autoclavados.

4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura em torno de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em condições de escuro para a indução e manutenção de calos e massas embriogênicas, e em fotoperíodo de 16 horas para a maturação dos embriões somáticos.

4.5 INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

4.5.1 Experimento 1

As sementes imaturas foram retiradas dos frutos no dia 16/07/2006, cinco dias após a primeira coleta. Após a desinfestação, os embriões foram individualizados e inoculados em meio de cultura WPM semi-sólido (4 gL^{-1} ágar Micromed[®]) contendo 5,0 ou 10,0 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) combinados com 0,5 ou 2,5 μM de cinetina (CIN).

Após 10 semanas de indução, foi realizado o primeiro subcultivo para meios com concentração de 2,4-D dez vezes menor (0,5 e 1,0 μM), mantendo-se as concentrações de CIN. Depois de oito semanas, foi realizado o segundo subcultivo, para os mesmos meios do primeiro subcultivo.

Após 12 semanas, os calos foram transferidos para meios com 2,5 μM de 2,4-D (terceiro subcultivo), mantendo-se as concentrações de CIN (0,5 e 2,5 μM).

4.5.2 Experimento 2

As sementes imaturas foram retiradas dos frutos no dia 20/07/2006, nove dias após a primeira coleta. Após a desinfestação, os embriões foram individualizados e inoculados em meio de cultura WPM semi-sólido (4 gL^{-1} ágar Micromed[®]) contendo 5,0 ou 10,0 μM de 2,4-D combinados com 0,5 ou 2,5 μM de benzilaminopurina (BAP).

Após 10 semanas de indução, foi realizado o primeiro subcultivo para meios com concentração de 2,4-D dez vezes menor (0,5 e 1,0 μM), mantendo-se as concentrações de BAP. Após oito semanas, foi realizado o segundo subcultivo, para os mesmos meios do primeiro subcultivo.

Depois de mais 12 semanas, os calos foram transferidos para meios com 2,5 μM de 2,4-D (terceiro subcultivo), mantendo-se as concentrações de BAP (0,5 e 2,5 μM).

4.5.3 Experimento 3

As sementes imaturas foram retiradas dos frutos no dia 30/10/2006, sete dias após a segunda coleta. Após a desinfestação, os embriões foram individualizados e inoculados em meio de cultura WPM semi-sólido acrescido de 0,5 gL^{-1} de caseína hidrolisada e 0,5 gL^{-1} de L-glutamina. Para a obtenção de consistência semi-sólida dos meios foram utilizados os agentes geleificantes gelrite (2 gL^{-1}) e ágar Micromed[®] (4 gL^{-1}). As concentrações de reguladores vegetais utilizadas na etapa de indução foram 5,0 ou 10,0 μM de 2,4-D combinados com 2,5 μM de CIN.

Após 12 semanas de permanência nos meios de indução, foi realizado o primeiro subcultivo, com a transferência dos calos para meios contendo um quarto da concentração inicial de 2,4-D (1,25 e 2,5 μM , respectivamente), mantendo-se idênticas as concentrações dos outros constituintes do meio.

Depois de 12 semanas do primeiro subcultivo, foi feito o segundo subcultivo, para a manutenção dos calos e massas embriogênicas e para maturação dos embriões somáticos obtidos, conforme os seguintes critérios: calos mais escuros e mais compactos foram transferidos para meio com 1,25 μM de 2,4-D e 2,5 μM CIN; calos amarelados e mais friáveis foram transferidos para 0,5 μM de 2,4-D e 2,5 μM CIN; calos friáveis esbranquiçados foram transferidos para meio sem reguladores vegetais; massas embriogênicas e embriões somáticos foram transferidos para meio com 10,0 μM de N^6 -(2-isopentenil)adenina (2-iP) e 0,5 μM de ácido naftalenoacético (ANA) (meio de maturação de embriões somáticos). Todos estes meios foram suplementados com 0,5 gL^{-1} caseína hidrolisada e 0,5 gL^{-1} de L-glutamina.

4.6 MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

As massas embriogênicas contendo embriões somáticos foram transferidas para o meio de maturação com 10,0 μM 2-iP e 0,5 μM ANA. Estas culturas com embriões foram retiradas das condições de escuro e mantidas em fotoperíodo de 16 horas.

4.7 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO E AVALIAÇÕES

Foram realizados três experimentos, segundo um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2, com quatro tratamentos de quatro repetições cada, sendo a unidade experimental composta de 10 explantes, totalizando 160 explantes por experimento.

Os experimentos foram avaliados a cada quatro semanas, observando-se os seguintes critérios: nenhuma resposta do embrião, crescimento do embrião, início de calo, formação de calo compacto ou friável, formação de massas embriogênicas, coloração dos calos e massas e iniciação de embriões somáticos em vários estádios de desenvolvimento: globular, cordiforme e torpedão.

A classificação das respostas morfogênicas segundo os critérios de avaliação foi procedida da seguinte forma:

- considerou-se nenhuma resposta quando o explante apresentou a mesma aparência e tamanho que no dia da instalação do experimento;
- foi considerado crescimento do embrião quando o embrião aumentou de tamanho, porém sem haver formação de calo (e em todos em que houve formação de calo/ massa, houve necessariamente expansão, mas eles foram classificados em outras categorias, conforme sua resposta morfogênica);
- os calos com coloração variando do esbranquiçado ao amarelo foram considerados como claros, e separados em compactos e friáveis. Os com coloração variando do bege-escuro ao preto foram classificados como escuros. Como, num mesmo explante, poderiam haver diferentes setores com diferentes respostas, por exemplo, um calo claro/ escuro compacto com porções de calo claro friável, procedeu-se da seguinte forma: não importando os outros setores, se houvessem porções de calo claro friável, o explante foi

classificado como claro friável; se houvessem setores claros e compactos sem haver setores friáveis, foi classificado como calo claro compacto; Foram classificados como calo escuro calos de coloração escura, tanto compactos quanto friáveis, e que não apresentassem porções mais claras. A classificação início de calo claro se refere tanto ao início de calo num embrião antes não responsivo, quanto ao surgimento de um pequeno calo claro sobre um embrião escuro.

- Foram classificadas como massas embriogênicas as com coloração bem branca e translúcida e com textura homogênea, o que as difere de calos claros friáveis.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1

5.1.1 Indução de calos

Na primeira semana após a inoculação dos embriões em meio de cultura, observou-se o crescimento dos mesmos e esse foi proporcional ao tamanho do explante.

As respostas morfogênicas começaram a ser visualizadas na segunda semana de indução, com o início de formação de calos na região do nó cotiledonar, cotilédone e na extremidade do eixo embrionário.

Os embriões oriundos de sementes imaturas recém-formadas cresceram menos e formaram menos calos quando comparados com os de sementes imaturas mais desenvolvidas.

Os calos formados apresentaram, na sua maioria, coloração branco-amarelada, em todas as combinações de reguladores testadas após quatro semanas (TABELA 1, FIGURAS 2A, 2B, 2D, 2F e 2H).

TABELA 1 – RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE *Aspidosperma polyneuron* OBTIDAS EM MEIO DE CULTURA WPM, COM COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS, APÓS QUATRO E OITO SEMANAS

Reguladores Vegetais	nenhuma resposta (%)		crescimento do embrião (%)		início de calo (%)		calo claro compacto (%)		calo claro friável (%)		calo escuro (%)	
	4 sem	8 sem	4 sem	8 sem	4 sem	8 sem	4 sem	8 sem	4 sem	8 sem	4 sem	8 sem
5,0 µM 2,4-D 0,5 µM CIN	29,4	20,0	5,9	6,7	11,8	0,0	41,1	46,6	5,9	20,0	5,9	6,7
5,0 µM 2,4-D 2,5 µM CIN	20,8	10,7	17,2	7,1	6,9	17,9	44,8	35,7	3,4	25,0	6,9	3,6
10,0 µM 2,4-D 0,5 µM CIN	9,5	9,5	4,8	9,5	4,8	4,8	52,4	47,6	19,0	19,1	9,5	9,5
10,0 µM 2,4-D 2,5 µM CIN	4,0	4,1	8,0	0,0	12,0	16,7	56,0	41,7	4,0	25,0	16,0	12,5

* calo claro: coloração variando do branco ao amarelo; calo escuro: coloração variando do bege-escuro ao marrom

Após oito semanas de indução, observou-se um aumento na formação dos calos e um início de escurecimento nas culturas, como pode ser observado nas figuras 2C, 2E, 2G e 2I.

Todas as combinações testadas foram eficientes na formação de calos (50 a 80%, considerando todas as colorações), sendo que as combinações com 10,0 μM de 2,4-D apresentaram resultados superiores na porcentagem e no tamanho dos calos, como pode ser observado na tabela 1 e nas figuras 2F, 2G, 2H e 2I.

As combinações com 5,0 μM de 2,4-D apresentaram um maior número de explantes que não apresentaram respostas, comparando-se com as combinações com 10,0 μM de 2,4-D (TABELA 1).

A etapa de indução teve duração de 10 semanas. Esta etapa foi seguida por um subcultivo para meios com redução da concentração de auxina para um décimo.

5.1.2 Manutenção dos calos e formação de massa embriogênica

Quatro semanas após o primeiro subcultivo, para meio com redução de um décimo da concentração de 2,4-D, observou-se a formação de massa embriogênica sobre embrião bem imaturo, oriundo de semente recém-formada (FIGURA 3A).

Em seis semanas, observou-se formação de massas embriogênicas em três dos tratamentos, como pode ser observado na tabela 2. As massas apareceram sobre os embriões menores e mais imaturos, sendo que 66,7% delas se formaram sobre calos amarelos compactos e 33,3% sobre calo marrom-escuro compacto.

Verificou-se também uma maior porcentagem de calos claros friáveis nos tratamentos com 1,0 μM de 2,4-D, e de calos claros mais compactos nas combinações com 0,5 μM de 2,4-D (TABELA 2).

TABELA 2 – FORMAÇÃO DE CALOS E MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE *Aspidosperma polyneuron*, EM MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM UM DÉCIMO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D UTILIZADA PARA INDUÇÃO (PRIMEIRO SUBCULTIVO), APÓS SEIS SEMANAS.

Meio de indução	1º subcultivo (após seis semanas)	nenhuma resposta (%)	calo claro compacto (%)	calo claro friável (%)	calo escuro (%)	massa embriogênica (%)
5,0 µM 2,4-D 0,5 µM CIN	0,5 µM 2,4-D 0,5 µM CIN	20,0	40,0	33,3	0,0	6,7
5,0 µM 2,4-D 2,5 µM CIN	0,5 µM 2,4-D 2,5 µM CIN	10,7	53,6	25,0	7,1	3,6
10,0 µM 2,4-D 0,5 µM CIN	1,0 µM 2,4-D 0,5 µM CIN	0,0	20,0	65,0	15,0	0,0
10,0 µM 2,4-D 2,5 µM CIN	1,0 µM 2,4-D 2,5 µM CIN	4,3	30,5	56,6	4,3	4,3

* calo claro: coloração variando do branco ao amarelo; calo escuro: coloração variando do bege-escuro ao marrom

Para evitar o escurecimento das culturas, após oito semanas de duração do primeiro subcultivo, foi realizado o segundo subcultivo, para meios com as mesmas concentrações de reguladores vegetais.

Após quatro semanas da realização deste segundo subcultivo, as culturas apresentavam formação de massas embriogênicas em todos os tratamentos (TABELA 3).

As figuras 3B, 3C e 3D mostram a formação de massas embriogênicas em meio de cultura com 0,5 µM de 2,4-D e 0,5 µM de CIN, após quatro semanas (3B) e dez semanas (3C e 3D).

Observou-se também que neste segundo subcultivo, houve um aumento no número de massas embriogênicas formadas, principalmente nos meios com 1,0 µM de 2,4-D, sendo que em 62,5% delas o desenvolvimento ocorreu sobre calo amarelo compacto e em 37,5% sobre calo marrom compacto (TABELA 3, FIGURAS 3E e 3F).

TABELA 3 – MANUTENÇÃO E FORMAÇÃO DE CALOS E MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE *Aspidosperma polyneuron*, APÓS QUATRO, OITO E DOZE SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO PARA MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM UM DÉCIMO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D UTILIZADA PARA INDUÇÃO

Reguladores Vegetais	nenhuma resposta (%)			calo claro compacto (%)			calo claro friável (%)			calo escuro (%)			massa embriogênica (%)		
	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem
0,5 µM 2,4-D 0,5 µM CIN	20,0	20,0	20,0	40,0	20,0	13,3	26,6	46,6	53,3	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
0,5 µM 2,4-D 2,5 µM CIN	7,1	7,1	7,1	28,6	21,4	14,3	39,3	46,5	46,5	17,9	17,9	25,0	7,1	7,1	7,1
1,0 µM 2,4-D 0,5 µM CIN	0,0	0,0	0,0	15,8	15,8	10,5	63,2	73,7	79,0	10,5	0,0	0,0	10,5	10,5	10,5
1,0 µM 2,4-D 2,5 µM CIN	4,3	4,3	4,3	30,5	21,8	21,8	47,8	56,5	56,5	8,7	4,3	4,3	8,7	13,1	13,1

* calo claro: coloração variando do branco ao amarelo; calo escuro: coloração variando do bege-escuro ao marrom

Como não houve a formação de embriões somáticos, isso poderia ser um indício de que os explantes não ficaram tempo o suficiente expostos ao 2,4-D na etapa de indução, ou que foi muito grande a redução da concentração desta auxina no primeiro subcultivo. Por esse motivo, as culturas foram subcultivadas para meios com aumento na concentração desta auxina para 2,5 µM, em combinação com 0,5 e 2,5 µM de CIN (terceiro subcultivo).

Em 12 semanas de permanência nos meios do terceiro subcultivo, as porcentagens de calo claro friável e de massas embriogênicas se mantiveram praticamente constantes, conforme pode ser visto na tabela 4.

Considerando as massas embriogênicas de todos os tratamentos em 12 semanas após o terceiro subcultivo, verificou-se que 20% delas se desenvolveram sobre calos amarelos compactos, 20% sobre calos esbranquiçados friáveis e 60% sobre calos marrons compactos. As massas embriogênicas se desenvolveram tanto em embriões bem imaturos quanto em embriões um pouco mais desenvolvidos (60% e 40%, respectivamente). Nos embriões bem imaturos a formação de massa embriogênica ocorreu, na maioria das vezes, sobre calo marrom compacto.

O tratamento que foi transferido de 1,0 µM de 2,4-D e 2,5 µM de CIN para 2,5 µM de 2,4-D e 2,5 µM de CIN apresentou o melhor resultado ao final do terceiro subcultivo, com formação de massas embriogênicas em 21,7% das culturas (TABELA 4, FIGURAS 3G, 3H E 3I).

TABELA 4 – RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE *Aspidosperma polyneuron* OBTIDAS APÓS QUATRO, OITO E DOZE SEMANAS DO TERCEIRO SUBCULTIVO, COM AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D PARA 2,5 μ M

meio 2° subcultivo	meio 3° subcultivo	nenhuma resposta (%)			calo claro compacto (%)			calo claro friável (%)			calo escuro (%)			massa embriogenética (%)		
		4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem
0,5 μ M 2,4-D 0,5 μ M CIN	2,5 μ M 2,4-D 0,5 μ M CIN	20,0	20,0	20,0	13,3	6,6	6,6	53,3	60,0	60,0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
0,5 μ M 2,4-D 2,5 μ M CIN	2,5 μ M 2,4-D 2,5 μ M CIN	7,1	7,1	7,1	14,4	21,4	17,9	50,0	50,0	50,0	21,4	14,4	17,9	7,1	7,1	7,1
1,0 μ M 2,4-D 0,5 μ M CIN	2,5 μ M 2,4-D 0,5 μ M CIN	0,0	0,0	0,0	5,3	0,0	0,0	78,9	79,0	84,2	5,3	10,5	5,3	10,5	10,5	10,5
1,0 μ M 2,4-D 2,5 μ M CIN	2,5 μ M 2,4-D 2,5 μ M CIN	4,3	4,3	4,3	8,7	8,7	13,1	56,5	56,5	52,2	13,1	13,1	8,7	17,4	17,4	21,7

* calo claro: coloração variando do branco ao amarelo; calo escuro: coloração variando do bege-escuro ao marrom

Em 10 meses (40 semanas) desde a instalação do experimento, não houve formação de embriões somáticos e as massas embriogênicas estão se desenvolvendo lentamente.

5.2 EXPERIMENTO 2

5.2.1 Indução de calos

As respostas morfogênicas obtidas em relação ao crescimento dos embriões e formação de calos foram semelhantes às do experimento 1. No experimento 2 utilizou-se as mesmas concentrações de 2,4-D e os mesmos tempos de transferência que no experimento 1, diferindo apenas na utilização de BAP em vez de CIN.

Nas primeiras quatro semanas de cultivo, houve baixa porcentagem de embriões que não responderam às combinações de reguladores vegetais, ou que apenas cresceram, sem formar calo, quando comparados com os resultados do experimento 1 (TABELA 5, TABELA 1).

Os embriões menores e mais imaturos formaram calos menores (FIGURA 4A, 4F E 4G).

Com as combinações de 2,4-D e BAP houve grandes diferenças entre as respostas morfogênicas, como podemos observar na figura 4B, na qual houve um grande crescimento do cotilédone com formação de calo nas suas extremidades. A mesma combinação de 5,0 μM de 2,4-D e 0,5 μM de BAP foi utilizada nos embriões das figuras 4A e 4E. Nas figuras 4D e 4E observamos grande formação de calo em todo o embrião.

As combinações de 10,0 μM de 2,4-D foram superiores às de 5,0 μM de 2,4-D com relação à porcentagem de formação de calos, como pode ser visto na tabela 5 e nas figuras 4H e 4I.

TABELA 5 – RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE *Aspidosperma polyneuron* OBTIDAS EM MEIO DE CULTURA WPM, COM COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS, APÓS QUATRO E OITO SEMANAS DE INDUÇÃO.

Reguladores Vegetais	nenhuma resposta (%)		crescimento do embrião (%)		início de calo (%)		calo claro compacto (%)		calo claro friável (%)		calo escuro (%)	
	4 sem	8 sem	4 sem	8 sem	4 sem	8 sem	4 sem	8 sem	4 sem	8 sem	4 sem	8 sem
5,0 μM 2,4-D 0,5 μM BAP	8,8	6,2	8,8	9,4	14,7	15,6	41,2	21,9	11,8	28,1	14,7	18,8
5,0 μM 2,4-D 2,5 μM BAP	9,1	0,0	3,0	6,3	12,1	15,6	57,6	46,9	15,2	15,6	3,0	15,6
10,0 μM 2,4-D 0,5 μM BAP	3,6	0,0	3,6	15,4	10,7	7,7	57,1	53,8	21,4	19,3	3,6	3,8
10,0 μM 2,4-D 2,5 μM BAP	0,0	0,0	0,0	3,7	14,8	0,0	59,3	55,6	25,9	29,6	0,0	11,1

* calo claro: coloração variando do branco ao amarelo; calo escuro: coloração variando do bege-escuro ao marrom

Em oito semanas de cultivo nos meios de indução, houve uma redução do número de embriões não responsivos. Também ocorreu um maior desenvolvimento dos calos formados e o escurecimento das culturas (TABELA 5, FIGURAS 4C, 4E e 4I).

As culturas foram mantidas em meio de indução durante 10 semanas, quando foi realizado o primeiro subcultivo, com transferência para meios de cultura com redução da concentração de 2,4-D a um décimo.

5.2.2 Manutenção dos calos e formação de massas embriogênicas

Seis semanas após o primeiro subcultivo, houve a formação de massa embriogênica (3,2%), sobre calo amarelo compacto e em embrião pequeno e bem imaturo, no tratamento com 0,5 μM 2,4-D e 2,5 μM BAP (TABELA 6).

TABELA 6 – FORMAÇÃO DE CALOS E MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE *Aspidosperma polyneuron*, EM MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM UM DÉCIMO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D UTILIZADA PARA INDUÇÃO (PRIMEIRO SUBCULTIVO), APÓS DUAS E SEIS SEMANAS.

Meio de indução	Meio do 1º subcultivo	nenhuma resposta (%)		crescimento do embrião(%)		calo claro compacto(%)		calo claro friável (%)		calo escuro (%)		massa embriogênica (%)	
		2 sem	6 sem	2 sem	6 sem	2 sem	6 sem	2 sem	6 sem	2 sem	6 sem	2 sem	6 sem
5,0 μM 2,4-D 0,5 μM BAP	0,5 μM 2,4-D 0,5 μM BAP	3,2	3,2	0,0	0,0	35,5	35,5	51,6	58,1	9,7	3,2	0,0	0,0
5,0 μM 2,4-D 2,5 μM BAP	0,5 μM 2,4-D 2,5 μM BAP	0,0	0,0	3,2	0,0	19,3	42,0	32,3	51,6	45,2	3,2	0,0	3,2
10,0 μM 2,4-D 0,5 μM BAP	1,0 μM 2,4-D 0,5 μM BAP	0,0	0,0	0,0	0,0	7,7	19,3	50,0	73,1	42,3	7,6	0,0	0,0
10,0 μM 2,4-D 2,5 μM BAP	1,0 μM 2,4-D 2,5 μM BAP	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1	37,0	48,2	51,9	40,7	11,1	0,0	0,0

* calo claro: coloração variando do branco ao amarelo; calo escuro: coloração variando do bege-escuro ao marrom

Assim como no experimento 1, para evitar o escurecimento das culturas, foi realizado um segundo subcultivo, oito semanas após o primeiro, para os mesmos meios utilizados neste.

Após o segundo subcultivo, observou-se alta porcentagem, em torno de 80%, de calos claros friáveis, principalmente nos meios com 1,0 μM 2,4-D (TABELA 7).

Nas figuras 5A e 5D, visualizamos a formação de massas embriogênicas após seis semanas nos meios do segundo subcultivo. Nas figuras 5B e 5C, pode-se visualizar as massas embriogênicas após oito semanas, período no qual elas se formaram em três dos tratamentos (TABELA 7), sendo que 40% delas se desenvolveram sobre calo claro friável e 60% sobre calo marrom compacto.

TABELA 7 – MANUTENÇÃO E FORMAÇÃO DE CALOS E MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE *Aspidosperma polyneuron*, APÓS QUATRO, OITO E DOZE SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO PARA MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM UM DÉCIMO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D UTILIZADA PARA INDUÇÃO

Reguladores Vegetais	calo claro compacto (%)			calo claro friável (%)			calo escuro (%)			massa embriogênica (%)		
	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem
0,5 μ M 2,4-D												
0,5 μ M BAP	25,8	25,8	22,6	61,3	61,3	67,7	6,5	6,5	3,2	3,2	3,2	3,2
0,5 μ M 2,4-D												
2,5 μ M BAP	35,5	29,0	25,8	51,6	61,3	64,5	9,7	3,2	3,2	3,2	6,5	6,5
1,0 μ M 2,4-D												
0,5 μ M BAP	15,4	16,0	16,0	76,9	84,0	84,0	7,7	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0 μ M 2,4-D												
2,5 μ M BAP	3,7	3,7	11,1	88,9	81,5	81,5	7,4	7,4	0,0	0,0	7,4	7,4

* calo claro: coloração variando do branco ao amarelo; calo escuro: coloração variando do bege-escuro ao marrom

Depois de 12 semanas nos meios do segundo subcultivo, foi realizado um terceiro subcultivo, para meios com 2,5 μ M de 2,4-D, porque, assim como no experimento 1, a ausência de embriões somáticos era um indício de que as culturas ficaram pouco tempo em meio de indução e, além disso, as massas estavam se desenvolvendo lentamente.

Após o terceiro subcultivo, as porcentagens de todas as variáveis permaneceram praticamente constantes (TABELA 8). Os meios com 2,5 μ M de BAP apresentaram os melhores resultados quanto à formação de massas embriogênicas quando comparados com os meios suplementados com 0,5 μ M desta citocinina (TABELA 8).

As figuras 5E e 5F mostram detalhes de uma massa embriogênica se desenvolvendo sobre calo amarelo, após quatro semanas do terceiro subcultivo.

TABELA 8 – RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE *Aspidosperma polyneuron* OBTIDAS APÓS QUATRO, OITO E DOZE SEMANAS DO TERCEIRO SUBCULTIVO, COM AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D PARA 2,5 μ M.

meio 2° subcultivo	meio 3° subcultivo	calo claro compacto (%)			calo claro friável (%)			calo escuro (%)			massa embriogênica (%)		
		4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem
0,5 μ M 2,4-D	2,5 μ M 2,4-D												
0,5 μ M BAP	0,5 μ M BAP	26,7	23,4	23,4	63,3	70,0	66,6	6,7	3,3	6,7	3,3	3,3	3,3
0,5 μ M 2,4-D	2,5 μ M 2,4-D												
2,5 μ M BAP	2,5 μ M BAP	29,0	12,9	3,2	61,3	77,4	83,8	3,2	3,2	6,5	6,5	6,5	6,5
1,0 μ M 2,4-D	2,5 μ M 2,4-D												
0,5 μ M BAP	0,5 μ M BAP	4,0	4,0	8,0	92,0	96,0	92,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0 μ M 2,4-D	2,5 μ M 2,4-D												
2,5 μ M BAP	2,5 μ M BAP	3,7	11,1	11,1	81,5	77,8	81,5	7,4	3,7	0,0	7,4	7,4	7,4

* calo claro: coloração variando do branco ao amarelo; calo escuro: coloração variando do bege-escuro ao marrom

Ao longo de 12 semanas em meio com elevação da quantidade de 2,4-D, não apareceram novas massas embriogênicas, dentre as quais 40% se desenvolviam sobre calos amarelos friáveis, 20% sobre calo amarelo compacto e 40% sobre calo marrom compacto, sendo que todos os calos marrons compactos eram provenientes de embriões bem imaturos.

Ao longo dos dez meses (40 semanas) de duração do experimento 2 não ocorreu a formação de embriões somáticos.

5.3 EXPERIMENTO 3

5.3.1 Indução de calos

O experimento 3 difere dos outros dois pela adição de caseína hidrolisada e L-glutamina nos meios de cultura (ambos na concentração de 0,5 gL⁻¹) e por testar dois diferentes agentes geleificantes (ágar e gelrite).

Nas primeiras quatro semanas de indução, verificou-se que poucos explantes não responderam aos tratamentos com reguladores vegetais. As porcentagens de crescimento, início de calo e formação de calos claros e escuros, neste período, foram bastante semelhantes em todos os tratamentos (TABELA 9).

Após seis semanas visualizamos calos bem desenvolvidos em meio de cultura com 5,0 μM ou 10,0 μM de 2,4-D e 2,5 μM de CIN, com 2 gL^{-1} de gelrite (FIGURA 6A e 6B). Observou-se, porém, que nos meios de cultura com ágar o crescimento dos calos foi, em geral, bem maior do que nos meios com gelrite (FIGURAS 6C e 6D).

TABELA 9 – RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE *Aspidosperma polyneuron* OBTIDAS EM MEIO DE CULTURA WPM, COM COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS, APÓS QUATRO, OITO E DOZE SEMANAS DE INDUÇÃO.

	nenhuma resposta (%)			crescimento do embrião (%)			início de calo (%)			calo claro compacto (%)			calo claro friável (%)			calo escuro (%)		
	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem
5,0 μM 2,4-D 2,5 μM CIN 2 gL^{-1} gelrite	5,9	5,9	5,9	29,4	2,9	2,9	5,9	14,7	2,9	0,0	11,8	5,9	58,8	64,7	76,5	0,0	0,0	5,9
10,0 μM 2,4-D 2,5 μM CIN 2 gL^{-1} gelrite	0,0	0,0	0,0	31,4	2,9	0,0	5,7	5,7	5,7	2,9	5,7	14,3	51,4	77,1	74,3	8,6	8,6	5,7
5,0 μM 2,4-D 2,5 μM CIN 4 gL^{-1} ágar	0,0	0,0	0,0	25,9	7,4	3,7	3,7	11,1	7,4	3,7	7,4	3,7	59,3	63,0	70,4	7,4	11,1	14,8
10,0 μM 2,4-D 2,5 μM CIN 4 gL^{-1} ágar	0,0	0,0	0,0	25,8	6,7	0,0	9,7	13,3	3,3	9,7	23,3	23,3	54,8	53,4	73,4	0,0	3,3	0,0

* calo claro: coloração variando do branco ao amarelo; calo escuro: coloração variando do bege-escuro ao marrom

** Todos os meios do experimento 3 foram suplementados com 0,5 gL^{-1} de caseína hidrolisada e 0,5 gL^{-1} de L-glutamina

Depois de 12 semanas de duração desta etapa, foi realizado o primeiro subcultivo, com transferência das culturas para meios com redução da concentração de 2,4-D a um quarto da utilizada para a indução.

Neste período foram observados embriões somáticos globulares no meio de cultura suplementado com 5,0 μM de 2,4-D e 2,5 μM de CIN, solidificado com 2 gL^{-1} de gelrite (FIGURA 7A).

5.3.2 Manutenção dos calos e formação de massas embriogênicas

A tabela 10 mostra que os calos transferidos para $\frac{1}{4}$ da concentração de 2,4-D apresentavam coloração branca a amarelada e regiões friáveis (FIGURAS 6H e 6I).

Quatro semanas após o primeiro subcultivo, houve a formação de massa embriogênica (3%) no meio de cultura com 1,25 μM de 2,4-D, 2,5 μM CIN e gelrite (TABELA 10, FIGURA 6E).

Após 12 semanas do primeiro subcultivo, havia massas embriogênicas tanto neste mesmo meio de cultura (só que com um aumento para 6,1%, ver figura 6E e 6F), quanto no meio com 2,5 μM 2,4-D, 2,5 μM CIN e 4 gL^{-1} ágar (na porcentagem de 3,3%) (TABELA 10, FIGURAS 6G, 6H, 6I e 7B). Todas as massas embriogênicas se formaram sobre embriões bem imaturos, sendo que 66,7% delas se desenvolveram sobre calo marrom compacto e 33,3% sobre calo branco friável.

TABELA 10 – FORMAÇÃO DE CALOS E MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE *Aspidosperma polyneuron*, EM MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM UM QUARTO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D UTILIZADA PARA INDUÇÃO (PRIMEIRO SUBCULTIVO), APÓS QUATRO, OITO E DOZE SEMANAS.

Meio de indução	Meio do 1º subcultivo	calo claro compacto (%)			calo claro friável (%)			calo escuro (%)			massa embriogênica (%)		
		4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem	4 sem	8 sem	12 sem
5,0 μM 2,4-D 2,5 μM CIN 2 gL^{-1} gelrite	1,25 μM 2,4-D 2,5 μM CIN 2 gL^{-1} de gelrite ***	9,4	6,3	6,3	59,4	65,5	75,0	28,1	21,9	12,4	3,1	6,3	6,3
10,0 μM 2,4-D 2,5 μM CIN 2 gL^{-1} gelrite	2,5 μM 2,4-D 2,5 μM CIN 2 gL^{-1} gelrite	8,6	8,6	8,6	71,4	65,6	68,6	20,0	25,8	22,8	0,0	0,0	0,0
5,0 μM 2,4-D 2,5 μM CIN 4 gL^{-1} ágar	1,25 μM 2,4-D 2,5 μM CIN 4 gL^{-1} ágar	14,8	11,1	11,1	59,2	62,9	62,9	26,0	26,0	26,0	0,0	0,0	0,0
10,0 μM 2,4-D 2,5 μM CIN 4 gL^{-1} ágar	2,5 μM 2,4-D 2,5 μM CIN 4 gL^{-1} ágar	10,0	6,7	6,7	63,4	60,0	60,0	26,6	33,3	30,0	0,0	0,0	3,3

* calo claro: coloração variando do branco ao amarelo; calo escuro: coloração variando do bege-escuro ao marrom

** Todos os meios do experimento 3 foram suplementados com 0,5 gL^{-1} de caseína hidrolisada e 0,5 gL^{-1} de L-glutamina

*** Já havia embriões somáticos neste meio antes do primeiro subcultivo

Cinco dias após a avaliação realizada em 12 semanas de subcultivo, foram observados embriões somáticos, nos estádios globular e cordiforme, em grande quantidade (em torno de 30) no tratamento com 1,25 μM 2,4-D e 2,5 μM CIN, solidificado com 2 gL^{-1} gelrite (FIGURA 7D). A figura 7C mostra embriões globulares formados após cinco semanas de cultivo em meio com 1,25 μM 2,4-D e 2,5 μM CIN, solidificado com 2 gL^{-1} gelrite.

No tratamento com 2,5 μM 2,4-D e 2,5 μM CIN solidificado com gelrite e no tratamento com 1,25 μM 2,4-D e 2,5 μM CIN solidificado com ágar também foram observados embriões somáticos (três no estágio globular e dois no estágio cordiforme, respectivamente).

Para evitar que a presença de 2,4-D causasse uma inibição do desenvolvimento destes embriões, foi realizado um segundo subcultivo, para meio de maturação (com 10,0 μM de 2-iP e 0,5 μM de ANA) para os embriões somáticos e meios de manutenção (suplementados com 1,25 ou 0,5 μM 2,4-D combinados com 2,5 μM de CIN ou meio sem regulador vegetal) para as outras respostas morfogênicas.

5.3.3 Manutenção de calos e de massas embriogênicas e maturação dos embriões somáticos

Quatro semanas após o segundo subcultivo, observou-se que os calos marrons compactos que foram subcultivados para os meios de cultura com 1,25 μM de 2,4-D, independentemente do agente geleificante formaram novos setores de calo claro friável sobre os calos (TABELA 11). Observou-se também a formação de novas massas embriogênicas no tratamentos com 1,25 μM de 2,4-D, 2,5 μM de CIN e 2 gL^{-1} de gelrite e no de 0,5 μM de 2,4-D, 2,5 μM de CIN e 4 gL^{-1} de ágar (TABELA 11). Também houve desenvolvimento de massa embriogênica nos meios com 10,0 μM de 2-iP e 0,5 μM de ANA (FIGURA 7E).

Houve formação de novos embriões somáticos, nos estádios globular, cordiforme e torpedo, em culturas que estavam no primeiro subcultivo em meio com 1,25 μM de 2,4-D, 2,5 μM de CIN e 2 gL^{-1} de gelrite e que foram transferidas para os meios com 0,5 μM de 2,4-D e 2,5 μM de CIN, os sem reguladores e os de 10,0 μM de 2-iP e 0,5 μM de ANA (TABELA 11). O maior número de embriões somáticos foi obtido em meio de cultura de maturação (10,0 μM de 2-iP e 0,5 μM de ANA), no qual, inclusive, ocorreu o desenvolvimento de mais embriões para os estádios cordiforme e torpedo (TABELA 11, FIGURAS 7F, 7G e 7H).

Nas outras combinações de reguladores vegetais do primeiro subcultivo (2,5 μM de 2,4-D, 2,5 μM de CIN e 2 gL^{-1} de gelrite ou 4 gL^{-1} de ágar e a de 1,25 μM de 2,4-D, 2,5 μM de CIN e 4 gL^{-1} de ágar) não houve a formação de novos embriões

após o segundo subcultivo, nem no meios de maturação, nem nos meios com 2,4-D ou sem reguladores (TABELA 11).

TABELA 11 – MANUTENÇÃO DE CALOS, MASSAS EMBRIOGÊNICAS E MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Aspidosperma polyneuron* EM MEIO DE CULTURA WPM, SUPLEMENTADO COM REGULADORES VEGETAIS APÓS QUATRO SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO.

meio 1°subcultivo	meio 2° subcultivo	calo claro compacto (%)	calo claro friável (%)	calo escuro (%)	massa embriogênica (%)	% de culturas com embriões somáticos	n° de embriões globulares	n° de embriões cordiformes	n° de embriões torpedo
1,25 µM 2,4-D + 2,5 µM CIN + 2 gL ⁻¹ gelrite	1,25 µM 2,4-D + 2,5 µM CIN	0,0	43,8	43,8	12,4	0,0	0	0	0
	0,5 µM 2,4-D + 2,5 µM CIN	4,3	68,0	19,2	0,0	8,5	14	11	6
	s/ regulador	3,6	71,4	14,3	0,0	10,7	13	4	1
	10,0 µM 2-iP + 0,5 µM ANA	0,0	38,5	7,7	23,1	30,7	27	33	10
2,5 µM 2,4-D + 2,5 µM CIN + 2 gL ⁻¹ gelrite	1,25 µM 2,4-D + 2,5 µM CIN	10,0	40,0	50,0	0,0	0,0	0	0	0
	0,5 µM 2,4-D + 2,5 µM CIN	4,5	86,4	9,1	0,0	0,0	0	0	0
	s/ regulador	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0	0	0
	10,0 µM 2-iP + 0,5 µM ANA	33,3	50,0	0,0	0,0	16,7	3	0	0
1,25 µM 2,4-D + 2,5 µM CIN + 4 gL ⁻¹ ágar	1,25 µM 2,4-D + 2,5 µM CIN	3,7	55,6	40,7	0,0	0,0	0	0	0
	0,5 µM 2,4-D + 2,5 µM CIN	0,0	90,2	9,8	0,0	0,0	0	0	0
	s/ regulador	5,9	88,2	5,9	0,0	0,0	0	0	0
	10,0 µM 2-iP + 0,5 µM ANA	25,0	0,0	25,0	0,0	50,0	0	2	0
2,5 µM 2,4-D + 2,5 µM CIN + 4 gL ⁻¹ ágar	1,25 µM 2,4-D + 2,5 µM CIN	0,0	53,5	46,5	0,0	0,0	0	0	0
	0,5 µM 2,4-D + 2,5 µM CIN	0,0	91,3	6,5	2,2	0,0	0	0	0
	s/ regulador	5,0	90,0	5,0	0,0	0,0	0	0	0
	10,0 µM 2-iP + 0,5 µM ANA	0,0	75,0	0,0	25,0	0,0	0	0	0

* calo claro: coloração variando do branco ao amarelo; calo escuro: coloração variando do bege-escuro ao marrom

** Todos os meios do experimento 3 foram suplementados com 0,5 gL⁻¹ de caseína hidrolisada e 0,5 gL⁻¹ de L-glutamina

6 DISCUSSÃO

Os resultados da formação de calos nas quatro primeiras semanas de indução dos três experimentos realizados neste trabalho, com porcentagens que variam entre 50% e 80%, foram semelhantes aos obtidos por Ribas *et al.* (2000) com peroba-rosa, que recomendaram as combinações de 5,0 e 10,0 μM de 2,4-D com 0,5 μM de CIN, BAP ou thidiazuron (TDZ) para a indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos imaturos e maduros. Estes resultados podem ser explicados pelo fato das auxinas estarem envolvidas na indução e iniciação de embriões somáticos. Em muitas espécies, o processo de iniciação se verifica ao se cultivar o explante em meio de cultura com concentração relativamente elevada de 2,4-D e as citocininas podem favorecer a formação de calo embriogênico (GUERRA *et al.*, 1999). Schenk e Hildebrandt (1972) afirmaram que baixas concentrações de citocininas foram necessárias para a embriogênese somática na maioria das culturas de dicotiledôneas.

Comparando-se os resultados dos experimentos 1 e 2, os quais diferiam pelo uso das citocininas CIN ou BAP (respectivamente), verificou-se que BAP foi mais eficiente na etapa de indução de formação de calos do que CIN, apresentando um percentual bem menor de embriões não responsivos em quatro semanas de indução: entre 0,0% e 9,1% para BAP e entre 4,0 a 29,4% para CIN. Além disso, também ocorreu um maior crescimento dos embriões, muitos dos quais ocupavam todo o tubo de ensaio e escureceram o meio de cultura mais rapidamente. Porém, ao longo dos subcultivos, a CIN se mostrou mais eficiente na formação de massas embriogênicas: após 12 semanas do terceiro subcultivo, havia entre 6,7% e 21,7% de culturas com massas embriogênicas nos meios com CIN, e entre 3,3% e 7,4% de culturas com massas embriogênicas nos meios com BAP.

O estado fisiológico dos explantes influenciou as respostas de embriogênese somática de peroba-rosa, como já havia sido citado por Ribas (1999). As massas embriogênicas se desenvolveram, nos três experimentos, sobre embriões de diferentes tamanhos, porém com maior frequência nos embriões menores e mais imaturos. Observou-se também que a formação de massas embriogênicas, nos três experimentos, ocorreu sobre calos independentemente de sua coloração, diferentemente do que ocorre na maioria das espécies, nas quais o escurecimento das culturas geralmente é inibitório à formação de células competentes à

embriogênese (GEORGE,1993), como ocorre para *Ocotea odorifera* (canela-sassafrás) (SANTA-CATARINA *et al.*, 2001).

No presente trabalho, a formação de embriões somáticos ocorreu apenas em embriões menores e mais imaturos, sendo que o padrão direto foi visto em apenas um dos explantes, predominando, portanto, o padrão indireto. Resultados semelhantes já tinham sido relatados por Ribas (1999) e Ribas *et al.* (2000), com a embriogênese somática em embriões zigóticos maduros e imaturos de peroba-rosa, em maior frequência nos embriões menores e mais imaturos. Ribas *et al.* (2000) também observaram a ocorrência dos padrões direto e indireto de embriogênese, sendo que o padrão direto ocorreu apenas em embriões imaturos.

Apenas no experimento 3, no qual houve a adição de caseína hidrolisada e L-glutamina, ocorreu a embriogênese somática. Isto está de acordo com o que foi observado por Ribas *et al.* (2000), que verificou que a adição de aminoácidos, como a caseína e a glutamina, estimulou a formação de embriões somáticos de peroba-rosa quando se compara com os resultados obtidos em meios sem esta suplementação. Além disso, nos experimentos 1 e 2, na etapa inicial de indução de calos, o subcultivo foi feito para meio com concentração de 2,4-D reduzida a 1/10 e, no experimento 3, esta redução foi de ¼. Provavelmente, nos primeiros experimentos ocorreu uma redução muito grande na concentração de 2,4-D que não foi suficiente para a indução de embriões somáticos, ocorrendo apenas a formação de massas embriogênicas que estavam se desenvolvendo lentamente.

No experimento 3, as respostas de embriogênese ocorreram entre 12 e 14 semanas desde a instalação, semelhante aos resultados vistos por Ribas *et al.* (2000) e Ribas (1999) para a peroba-rosa. O melhor resultado foi obtido nas culturas induzidas em meio suplementado com 5,0 µM de 2,4-D combinado com 2,5 µM de CIN, com 2 gL⁻¹ de gelrite e com caseína hidrolisada e L-glutamina, subcultivado para meio com redução para 1,25 µM de 2,4-D, ocorrendo a formação de cerca de 30 embriões somáticos globulares. A redução ou a ausência de auxina para o desenvolvimento e maturação de embriões somáticos já havia sido relatada por Sharp *et al.* (1980).

As culturas do experimento 3 foram submetidas a mais um subcultivo, para meio com a mesma combinação de reguladores (1,25 µM de 2,4-D e 2,5 µM de CIN), meio com 0,5 µM de 2,4-D e 2,5 µM de CIN, meio sem reguladores e meio de

maturação com 10,0 μM de 2-iP e 0,5 μM de ANA, obtendo-se, após quatro semanas, a formação de 89 novos embriões somáticos, totalizando 124 embriões, sendo 54 deles globulares, 48 cordiformes e 17 torpedos. Do total desses novos embriões somáticos, 18 se formaram no meio sem regulador, 31 no meio com 0,5 μM de 2,4-D e 40 no meio de maturação, o qual também possibilitou um desenvolvimento mais rápido para os estádios cordiforme e torpedo. Uma combinação de reguladores semelhante (12,3 μM de 2-iP e 0,5 μM de ANA) já havia sido recomendada para a maturação de embriões somáticos de peroba-rosa (RIBAS *et al.*, 2000)

Ribas (1999) observou a formação de embriões somáticos de peroba-rosa após 12 a 14 semanas em meio WPM, solidificado com 4,5 gL^{-1} de ágar e suplementado com 0,5 gL^{-1} de caseína e 0,5 gL^{-1} de glutamina, com os reguladores 2,4-D (2,5 a 10 μM) em combinação com CIN, BAP ou TDZ (0,5 μM), condições nas quais foram vistos embriões em 20% das culturas, sendo que o número de embriões globulares variou de 3 a 6, e com menor frequência foram vistos embriões cordiformes.

Com o presente trabalho, verificou-se que houve uma otimização da quantidade de embriões somáticos de peroba-rosa formados em meio solidificado com gelrite, o que está de acordo com George (1993) que cita que o uso de gelrite pode otimizar o número de embriões somáticos produzidos em vários cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e de arroz (*Oryza sativa*).

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho contribuiu para as etapas iniciais de indução e manutenção de massas embriogênicas. No entanto, para o estabelecimento de um protocolo de embriogênese somática, ainda há a necessidade de mais estudos para as etapas de maturação e conversão de embriões somáticos em plantas.

Foram observados os padrões de embriogênese somática direto e, com maior frequência, indireto, a partir de embriões menores e mais imaturos, indicando com isso que o estado fisiológico dos explantes interferiu nas respostas de embriogênese.

A adição de aminoácidos ao meio de cultura interferiu nas respostas de embriogênese, sendo recomendada a utilização de $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de caseína hidrolisada e de $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de L-glutamina para a embriogênese somática de peroba-rosa.

O gelrite foi mais eficiente que o ágar para a indução de massas embriogênicas e de embriões somáticos, sendo recomendado como agente geleificante da embriogênese somática de peroba-rosa. Quanto à combinação de reguladores vegetais, para a etapa de indução recomenda-se a combinação de $5,0 \mu\text{M}$ de 2,4-D e $2,5 \mu\text{M}$ de CIN, seguida de subcultivo para $1,25 \mu\text{M}$ de 2,4-D e $2,5 \mu\text{M}$ de CIN (para a manutenção das culturas) e de $10,0 \mu\text{M}$ de 2-iP e $0,5 \mu\text{M}$ de ANA para a maturação dos embriões somáticos.

Novos subcultivos com concentrações reduzidas de auxinas ou com ausência de regulador vegetal serão realizados para a multiplicação de massas embriogênicas. Também serão testados outros meios de cultura de maturação (com o uso de ácido abscísico ou de agentes osmóticos) e meios de conversão, para a otimização da embriogênese somática como forma de propagação massal de peroba-rosa.

FIGURAS

FIGURA 1. FRUTOS E SEMENTES DE *Aspidosperma polyneuron* COLETADOS NO INSTITUTO FLORESTAL DE SÃO PAULO. **1A** – FRUTOS IMATUROS DA PRIMEIRA COLETA EM 11/07/2006; **1B** – SEMENTES NO ÍNICIO DE SUA FORMAÇÃO OBTIDAS DA PRIMEIRA COLETA; **1C** – SEMENTES MAIS DESENVOLVIDAS DA PRIMEIRA COLETA; **1D** - FRUTOS IMATUROS DA SEGUNDA COLETA EM 23/10/2006; **1E** – SEMENTES MAIS IMATURAS E MAIS DESENVOLVIDAS DA SEGUNDA COLETA.

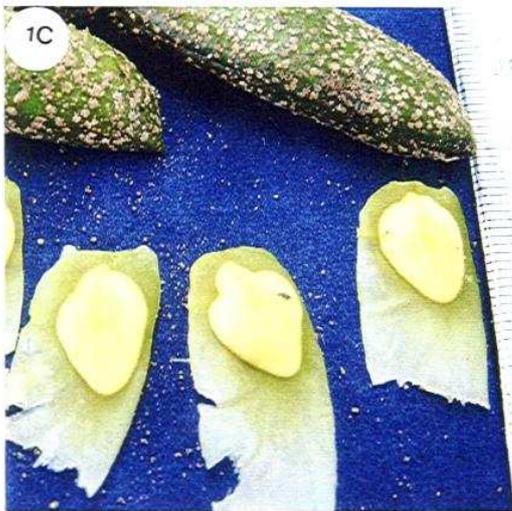
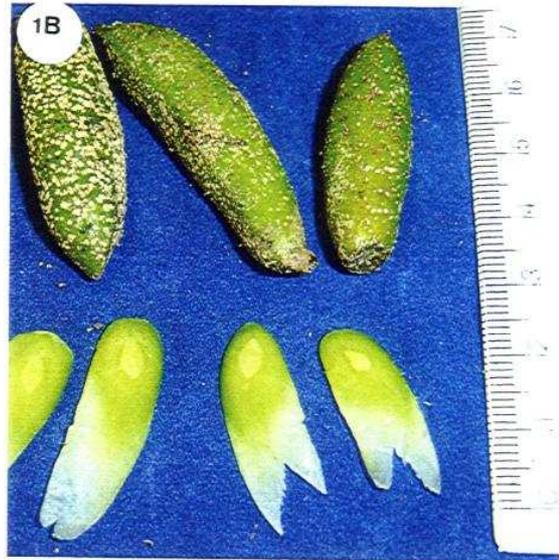


FIGURA 2. CALOS DE *Aspidosperma polyneuron* FORMADOS EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS (EXPERIMENTO 1). **2A** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 5,0 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN, APÓS QUATRO SEMANAS; **2B** E **2C**– CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 5,0 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN, APÓS QUATRO SEMANAS (2B) E OITO SEMANAS (2C); **2D** E **2E** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 5,0 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE CIN, APÓS 4 SEMANAS (2D) E OITO SEMANAS (2E); **2F** E **2G** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10,0 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN, APÓS 4 SEMANAS (2F) E OITO SEMANAS (2G); **2H** E **2I**- CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10,0 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE CIN, APÓS 4 SEMANAS (2H) E OITO SEMANAS (2I).

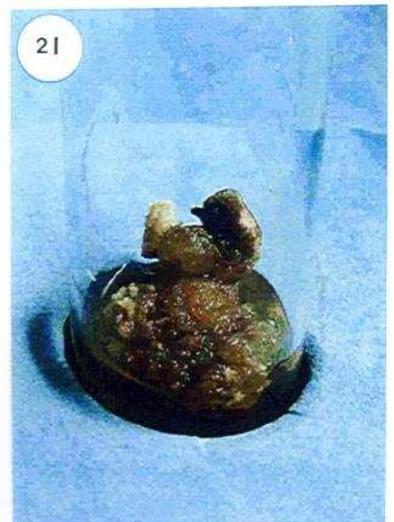
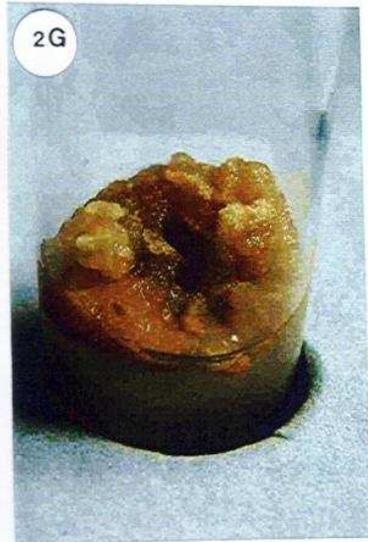
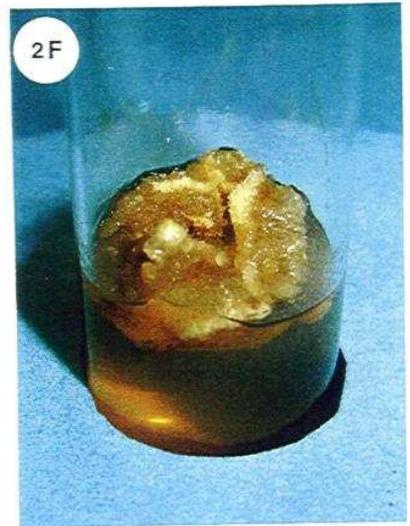
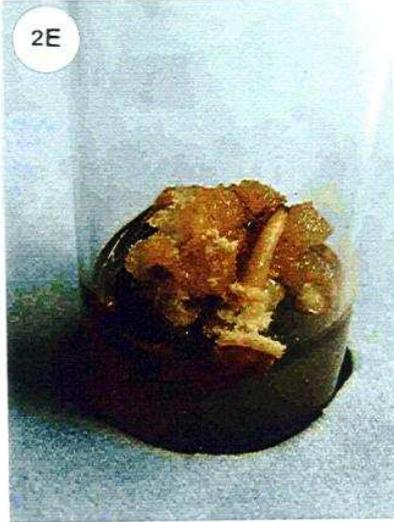
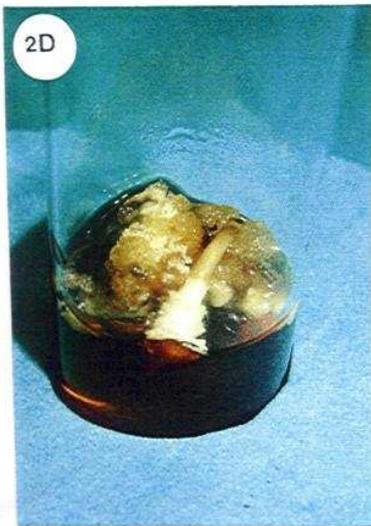
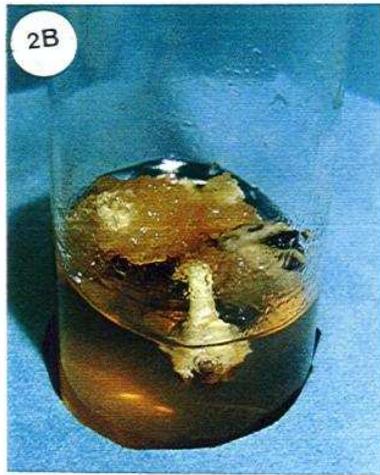
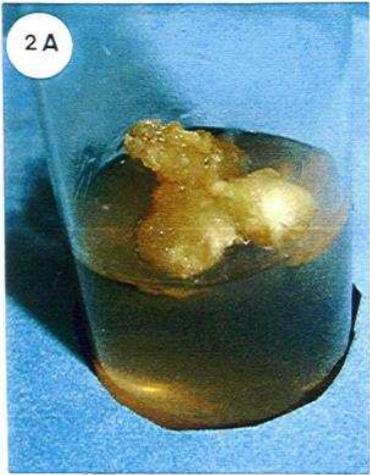


FIGURA 3- MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE *Aspidosperma polyneuron* FORMADAS EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS (EXPERIMENTO 1). **3A**-MASSA EMBRIOGÊNICA SE DESENVOLVENDO NO COTILÉDONE DO EMBRIÃO, APÓS QUATRO SEMANAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA, COM 0,5 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN; **3B** – MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA NO EMBRIÃO APÓS QUATRO SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO PARA MEIO DE CULTURA COM 0,5 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN; **3C** E **3D** - MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA NO EMBRIÃO APÓS 10 SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA COM 0,5 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN; **3E** E **3F** - MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA NO EMBRIÃO APÓS 10 SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA COM 1,0 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE CIN; **3G** E **3H** – MASSA EMBRIOGÊNICA SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA COM 2,5 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE CIN APÓS QUATRO SEMANAS DO TERCEIRO SUBCULTIVO; **3I** - MASSA EMBRIOGÊNICA SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA COM 2,5 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE CIN, APÓS OITO SEMANAS DO TERCEIRO SUBCULTIVO.

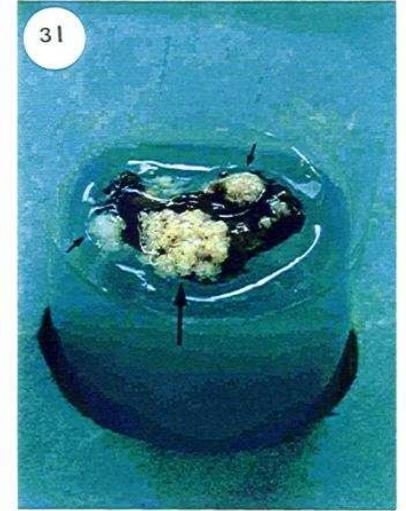
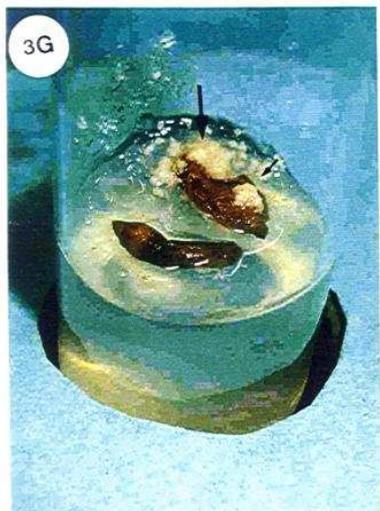
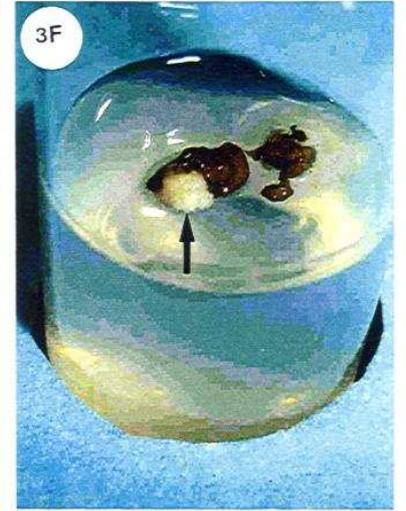
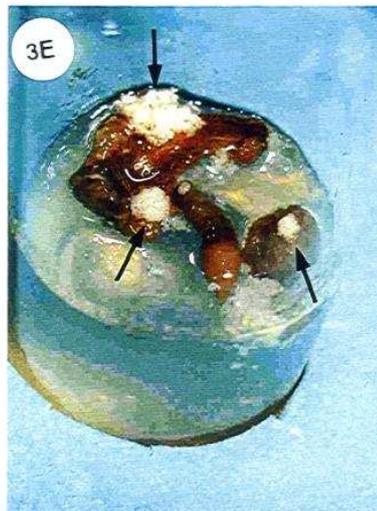
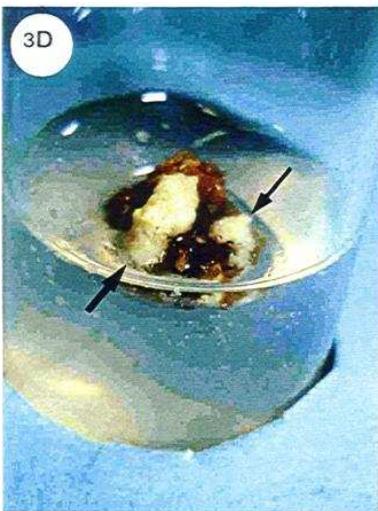
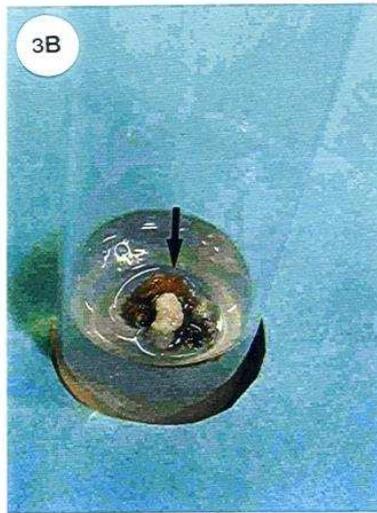
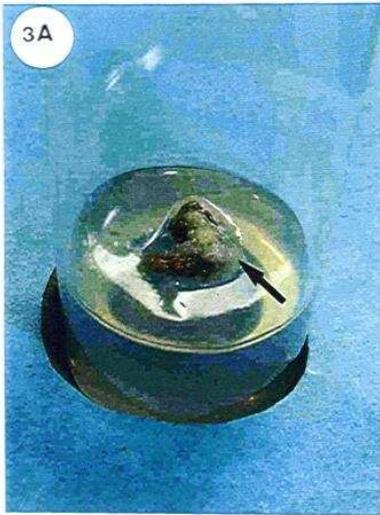


FIGURA 4 - CALOS DE *Aspidosperma polyneuron* FORMADOS EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS (EXPERIMENTO 2). **4 A** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 5,0 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS; **4B E 4C** – CALO FORMADO SOBRE EMBRIÃO COM GRANDE DESENVOLVIMENTO DO COTILÉDONE EM MEIO DE CULTURA COM 5,0 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS (4B) E OITO SEMANAS (4C); **4D E 4E** – CALO FORMADO EM TODO EMBRIÃO EM MEIO DE CULTURA COM 5,0 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS (4D) E OITO SEMANAS (4E); **4F** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 5,0 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS; **4G** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10,0 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS; **4 H** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10,0 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS; **4I** – CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10,0 μM DE 2,4-D E 0,5 μM DE BAP, APÓS OITO SEMANAS.

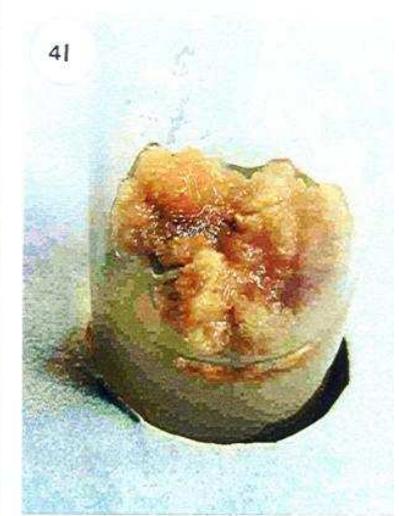
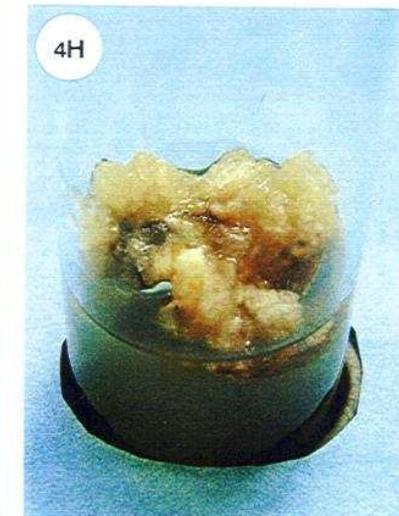
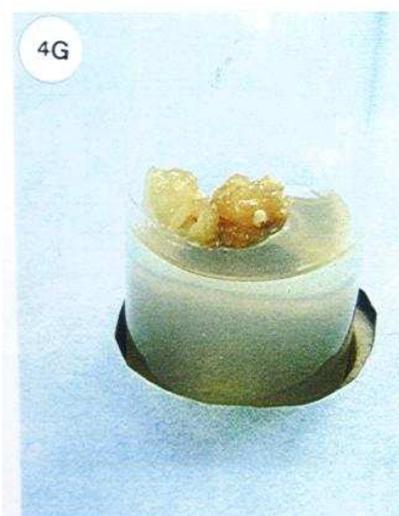
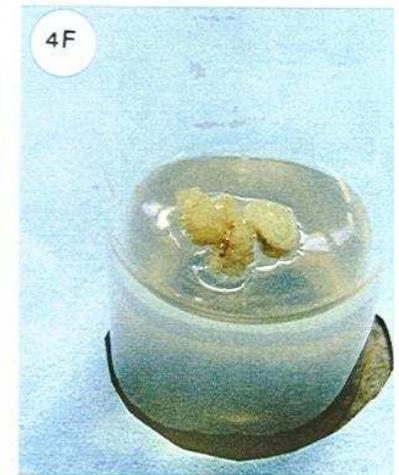
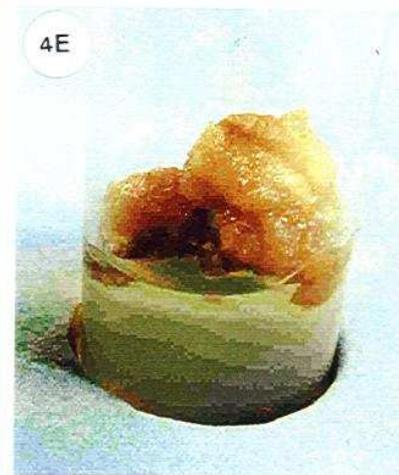
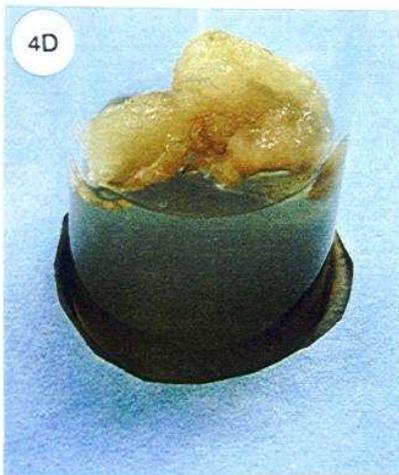
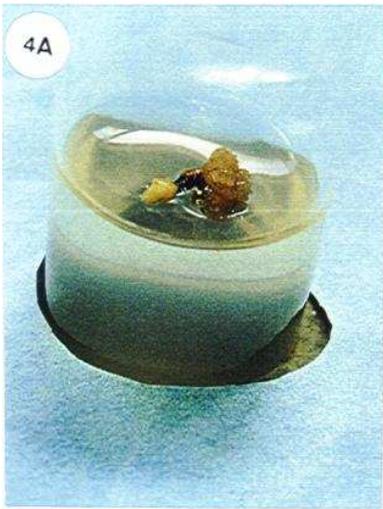


FIGURA 5 – MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE *Aspidosperma polyneuron* FORMADAS EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS (EXPERIMENTO 2). **5A** E **5D** – MASSA FORMADA EM MEIO DE CULTURA COM 0,5 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE BAP, APÓS 6 SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO (5A) E OITO SEMANAS (5D); **5B**- MASSA FORMADA EM MEIO DE CULTURA COM 0,5 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE BAP, APÓS OITO SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO; **5C**- MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA EM MEIO COM 1,0 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE BAP, APÓS OITO SEMANAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO; **5E** E **5F** – MASSA EMBRIOGÊNICA SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA COM 2,5 μM DE 2,4-D E 2,5 μM DE BAP, APÓS QUATRO SEMANAS DO TERCEIRO SUBCULTIVO.

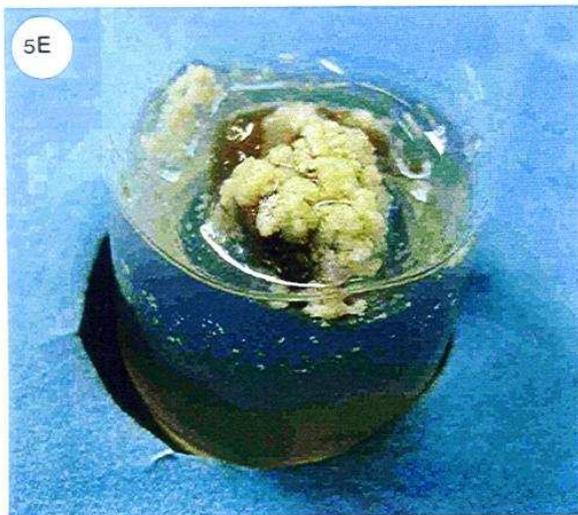
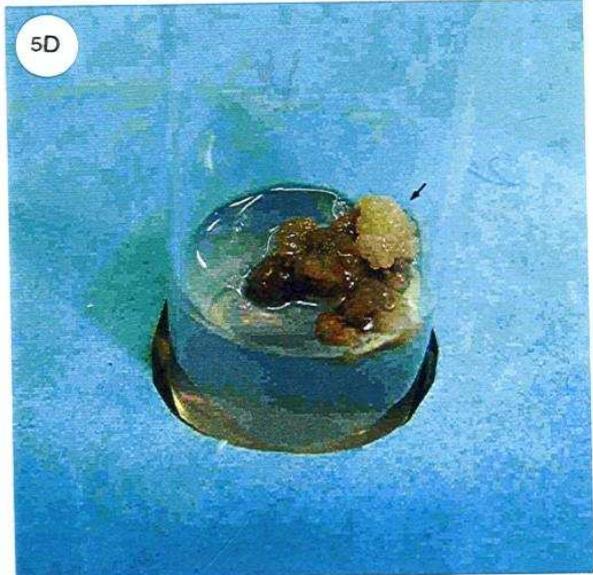
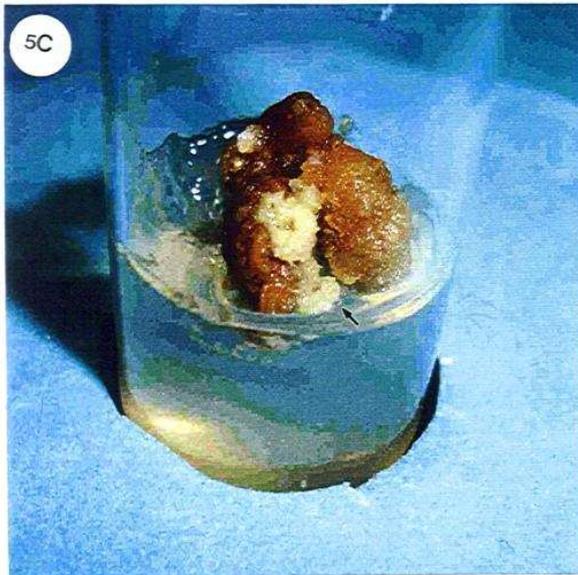
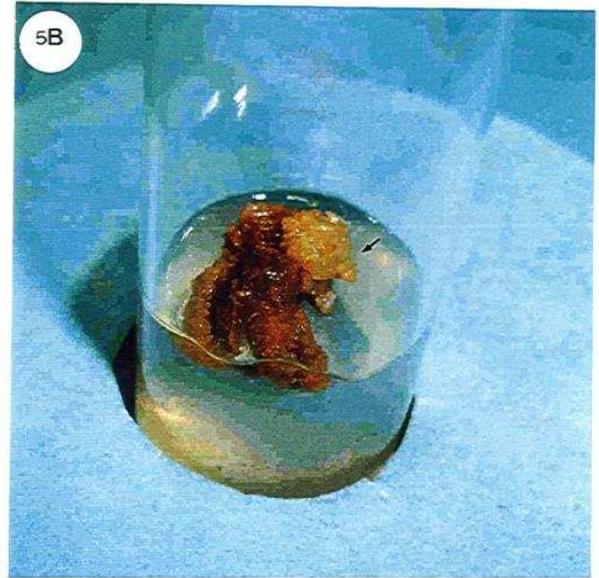
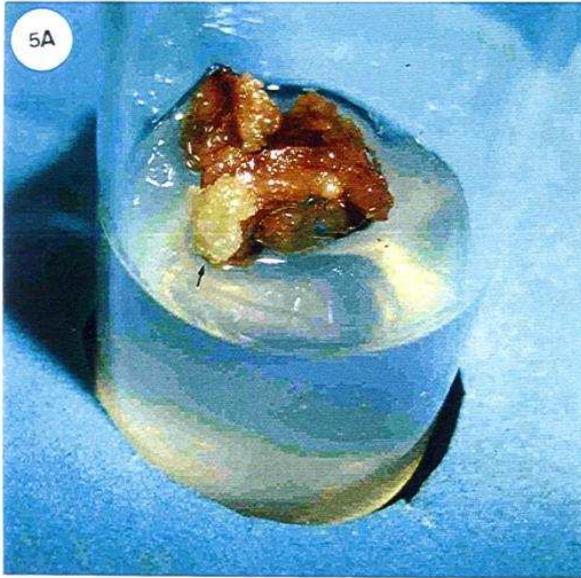


FIGURA 6. CALOS DE *Aspidosperma polyneuron* FORMADOS EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS, COM 0,5 GL⁻¹ DE CASEÍNA HIDROLISADA E GLUTAMINA (EXPERIMENTO 3). **6A-** CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 5,0 μM DE 2,4-D, 2,5 μM DE CIN E 2 GL⁻¹ DE GELRITE, APÓS SEIS SEMANAS; **6B-** CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10,0 μM DE 2,4-D, 2,5 μM DE CIN E 2 GL⁻¹ DE GELRITE, APÓS SEIS SEMANAS; **6C-** CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 5,0 μM DE 2,4-D, 2,5 μM DE CIN E 4 GL⁻¹ DE ÁGAR, APÓS SEIS SEMANAS; **6D-** CALO FORMADO EM MEIO DE CULTURA COM 10,0 μM DE 2,4-D, 2,5 μM DE CIN E 4 GL⁻¹ DE ÁGAR, APÓS SEIS SEMANAS; **6E-** CALO COM MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA EM MEIO COM 1,25 μM DE 2,4-D, 2,5 μM DE CIN E 2 GL⁻¹ DE GELRITE, APÓS SEIS SEMANAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO; **6F-** CALO COM MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA EM MEIO COM 1,25 μM DE 2,4-D, 2,5 μM DE CIN E 2 GL⁻¹ DE GELRITE, APÓS DEZ SEMANAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO; **6G-** CALO COM MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA EM MEIO COM 2,5 μM DE 2,4-D, 2,5 μM DE CIN E 2 GL⁻¹ DE GELRITE, APÓS ONZE SEMANAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO; **6H-** REGIÃO DO COTILÉDONE EM MEIO DE CULTURA COM 1,25 μM DE 2,4-D, 2,5 μM DE CIN E 4 GL⁻¹ DE ÁGAR, APÓS SEIS SEMANAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO; **6I** – OUTRA PARTE DO EMBRIÃO (6H) COM O EIXO EMBRIONÁRIO SE DESENVOLVENDO EM MEIO DE CULTURA COM 1,25 μM DE 2,4-D, 2,5 μM DE CIN E 4 GL⁻¹ DE ÁGAR, APÓS SEIS SEMANAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO.

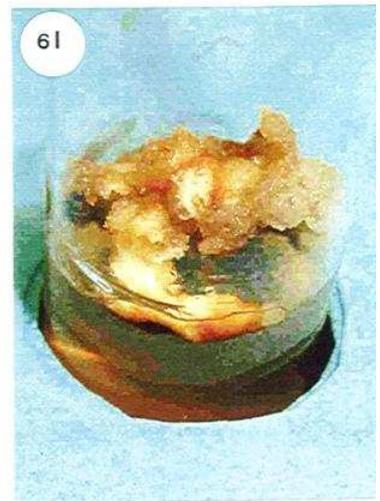
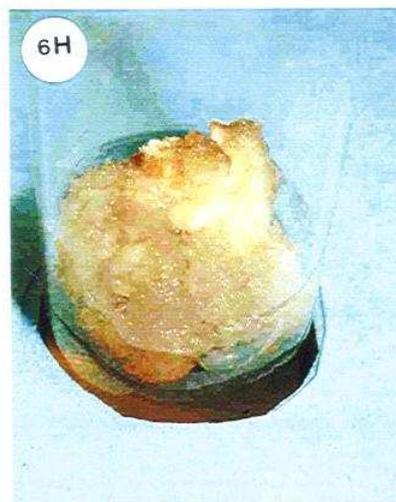
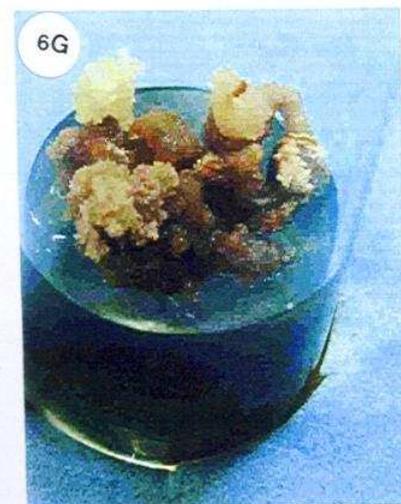
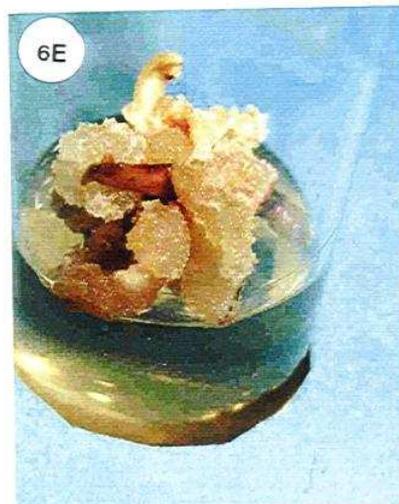
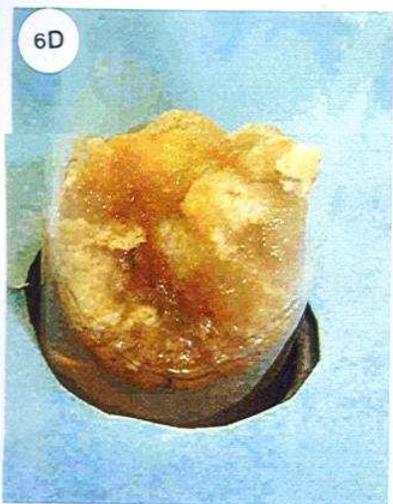
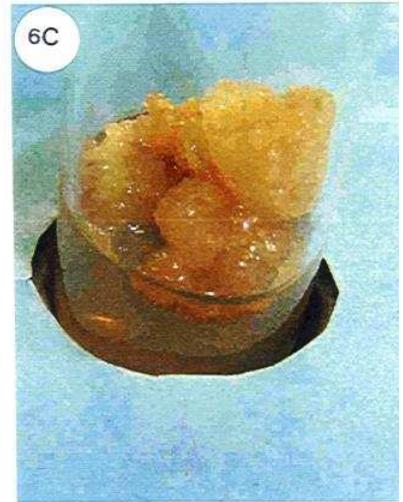
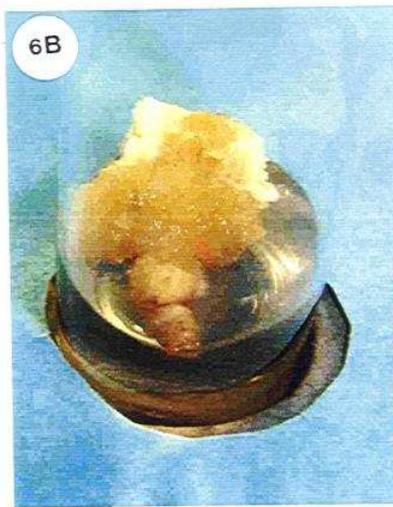
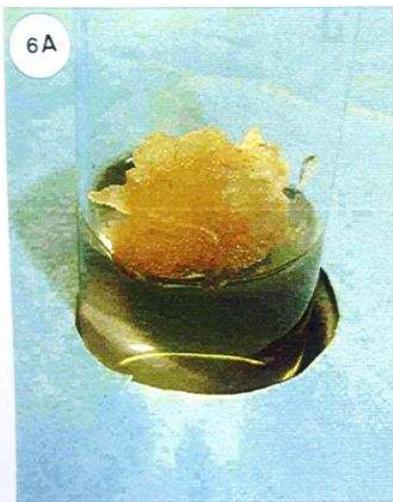
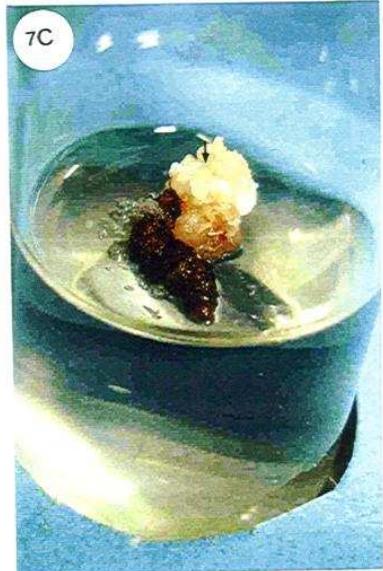
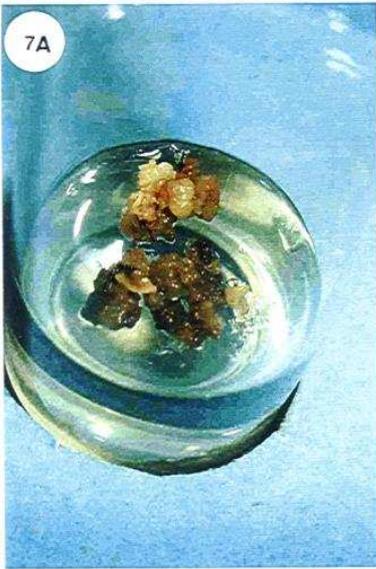


FIGURA 7. MASSAS EMBRIOGÊNICAS E EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Aspidosperma polyneuron*, OBTIDOS EM MEIO DE CULTURA WPM, ACRESCIDO DE COMBINAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS, COM 0,5 GL⁻¹ DE CASEÍNA HIDROLISADA E GLUTAMINA (EXPERIMENTO 3). **7A** – EMBRIÕES GLOBULARES FORMADOS APÓS 12 SEMANAS DE PERMANÊNCIA EM MEIO DE CULTURA COM 2 GL⁻¹ DE GELRITE, 5,0 µM DE 2,4-D E 2,5 µM DE CIN; **7B**- MASSA EMBRIOGÊNICA FORMADA EM MEIO DE CULTURA COM 4 GL⁻¹ DE ÁGAR, 10,0 µM DE 2,4-D E 2,5 µM DE CIN, APÓS 12 SEMANAS; **7C**- EMBRIÕES GLOBULARES FORMADOS NA REGIÃO COTILEDONAR, APÓS CINCO SEMANAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA COM 2 GL⁻¹ DE GELRITE, 1,25 µM DE 2,4-D E 2,5 µM DE CIN; **7D**- EMBRIÕES GLOBULARES FORMADOS APÓS DEZ SEMANAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA COM 2 GL⁻¹ DE GELRITE, 1,25 µM DE 2,4-D E 2,5 µM DE CIN; **7E** – MASSA EMBRIOGÊNICA SE DESENVOLVENDO APÓS TRÊS SEMANAS DA TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE CULTURA COM 10,0 µM DE 2-IP E 0,5 µM DE ANA; **7F** – EMBRIÕES SOMÁTICOS NO ESTÁDIO TORPEDO SE DESENVOLVENDO APÓS TRÊS SEMANAS DA TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE CULTURA COM 10,0 µM DE 2-IP E 0,5 µM DE ANA; **7G** E **7H** – EMBRIÕES SOMÁTICOS GLOBULARES E CORDIFORMES SE DESENVOLVENDO SOBRE MASSA EMBRIOGÊNICA, APÓS TRÊS SEMANAS DA TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE CULTURA COM 10,0 µM DE 2-IP E 0,5 µM DE ANA.



7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONGA, J.M.; Von ADERKAS, P. **In vitro culture of trees** – Forestry Series. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 38, p. 66-106, 1992.

CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. EMBRAPA-CNPA, Campina Grande, p. 16, 2003.

Disponível em: < <http://www.cnpa.embrapa.br/publicacoes/2003/DOC116.PDF>>
Acesso em: 30/05/2007.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. EMBRAPA-CNPF, Colombo, p. 79-84, 1994.

DIAS, M.C.; VIEIRA, A.O.S.; NAKAJIMA, J.N.; PIMENTA, J.A.; LOBO, P.C. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares do rio Iapó, na bacia do rio Tibagi, Tibagi, PR. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 183-195, ago 1998.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, A.; SAMAJ, J. (eds.) **Plant Cell Monographs: Somatic Embryogenesis**. Springer-Verlag, Berlin, v. 2, p. 85-101, 2005.

FERREIRA, O.P. (Coord.) **Madeira: uso sustentável na construção civil**. IPT – SVMMA – SindusCon-SP, São Paulo, p. 30, 2003.

Disponível em: <http://portal.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/meio_ambiente/qualidade_ambiental/madeira/0001> Acesso em: 03/03/2007.

FINER, J.J. Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R.A. **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford University Press, New York, 2 ed., p. 99-125, 1994.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: The technology**. Exegetics Limited, England, 1 ed., v. 1, p. 285-455, 1993.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: In practice**. Exegetics Limited, England, 2 ed., v. 2, p. 619-631, 1996.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.) **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA-CBAB, Brasília, v. 2, p. 533-568, 1999.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES Jr., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. Prentice Hall, New Jersey, 7 ed., p. 639-643, 2002.

HATSCHBACH, G.; ZILLER, S.R. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado do Paraná**. SEMA/GTZ, Curitiba, p. 139, 1995.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings - International Plant Propagators' Society**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 4 ed., v. 1, p. 41, 2002.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. J. Olympio, Rio de Janeiro, 2 ed., p. 233-234, 1981.

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

PHILLIPS, G.C.; HUBSTENBERGER, J.F.; HANSEN, E.E. Plant regeneration from callus and cell suspension cultures by somatic embryogenesis. In: GAMBORG, O.L.; PHILLIPS, G.C. (Eds.) **Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods**. Springer-Verlag, Berlin, p. 81-90, 1995.

PREECE, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 1, n. 1. p. 26-36, mai 1995.

RIBAS, L.L.F. **Morfogênese *in vitro* e micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. (Peroba-Rosa)**. Curitiba, 1999. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) Universidade Federal do Paraná, 175 p.

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

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S.C.; PEDROTTI, E.L. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n.4 (suplemento), p. 501-510, dez 2001.

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

SHARP, W.R.; SONDAHL, M.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, v. 2, p. 268-310, 1980.

SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S. Morfo-anatomia do fruto e da plântula de *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 3, p. 439-447, 1992.

TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L.C.; DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 9, p. 1873-1899, 1991.

TOREZAN, J. M. D.; SOUZA, R. F.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; CAMARGO, E. H.; VANZELA, A. L. L. Genetic variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 2, p. 171-180, 2005.

ZENID, G.J. Madeira na Construção Civil. In: 54° Congresso Nacional de Botânica Belém, 2003. Desafios da Botânica Brasileira no Novo Milênio: Inventário, Sistematização e Conservação da Diversidade Vegetal – 54° Congresso Nacional de Botânica e 3ª Reunião Amazônica, p. 20-21, 2003.

ANEXOS

ANEXO 1 – Meio WPM (LLOYD e McCOWN, 1980):

Composição	mg L⁻¹
macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	400
CaCl ₂ . 2H ₂ O	96
Ca(NO ₃) ₂	556
KH ₂ PO ₄	170
K ₂ SO ₄	990
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
micronutrientes	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25
Tiamina – HCl	10
Ácido Nicotínico	0,5
Piridoxina – HCl	0,5
Glicina	2,0
Mio-inositol	100
Sacarose	20000