

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAYTE SAMPAIO CESÁRIO DA SILVA SESTREM

ESTUDO DAS ETAPAS INICIAIS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus caribaea* var. *hondurensis*

CURITIBA

2018

MAYTE SAMPAIO CESÁRIO DA SILVA SESTREM

ESTUDO DAS ETAPAS INICIAIS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus caribaea* var. *hondurensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Departamento de Ciências Florestais, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Ciências Florestais.

Orientadora: Profa. Dra. Giovana Bomfim de Alcantara

Coorientadora: Dra. Juliana Degenhardt Goldbach

CURITIBA

2018

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR

Sestrem, Mayte Sampaio Cesário da Silva

Estudo das etapas iniciais da embriogênese somática em *Pinus caribaea* var. *Hondurensis* / Mayte Sampaio Cesário da Silva Sestrem. – Curitiba, 2018.

56 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Giovana Bomfim de Alcantara

Coorientadora: Dra. Juliana Degenhardt Goldbach

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba, 26/03/2018.

Área de concentração: Silvicultura.

1. Melhoramento genético. 2. Pinheiro-do-caribe. 3. Conífera. 4. Teses. I. Alcantara, Giovana Bomfim de. II. Goldbach, Juliana Degenhardt. III. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDD – 634.9

CDU – 634.0.16

Bibliotecária: Berenice Rodrigues Ferreira – CRB 9/1160



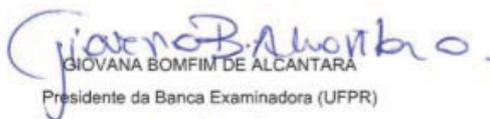
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA  
FLORESTAL

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA FLORESTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MAYTE SAMPAIO CESÁRIO DA SILVA SESTREM** intitulada: **ESTUDO DAS ETAPAS INICIAIS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus caribaea* var. *hondurensis***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

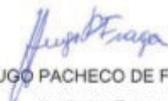
Curitiba, 26 de Março de 2018.

  
GIOVANA BOMFIM DE ALCANTARA  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



MARGUERITE GERMAINE GHISLAINE QUOIRIN

Avaliador Externo (UFPR)



HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA

Avaliador Externo (UFPR)



À Deus em primeiro lugar, à  
minha mãe Elizabeth, ao meu pai  
Neto, à minha vovó Diair,  
minha irmã Mayre e meu marido  
Roberto, meus maiores  
incentivadores nessa caminhada.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Deus que me concedeu a vida e tem me abençoado e me sustentado até hoje com sua graça e misericórdia.

À minha família pelo apoio incondicional, especialmente à minha mãe Elizabeth e minha vovó Diar que me acompanharam diariamente na realização de mais esse sonho. À minha irmã Mayre que me sustenta em orações e incentivo. Ao meu pai Neto, que mesmo distante nunca me deixou faltar amor e carinho. Ao meu marido Roberto, meu companheiro e melhor amigo, que abriu mão da nossa convivência diária para que eu pudesse voltar à Curitiba para fazer o mestrado, sem medir esforços para essa conquista, sendo sempre o meu maior incentivador, não me deixando desanimar. Amo muito vocês, nada disso seria possível sem o apoio, compreensão, paciência e amor de todos!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Giovana Bomfim de Alcantara, pela orientação e paciência ao longo desses dois anos. À Dr.<sup>a</sup> Juliana Degenhardt-Goldbach, pela co-orientação e acompanhamento diário na Embrapa Florestas sempre me auxiliando no que fosse preciso. Ao Dr<sup>o</sup> Hugo Pacheco de Freitas Fraga pelo auxílio e participação na pré-defesa.

À Dr<sup>a</sup> Ananda Virgínia de Aguiar e ao Wanderlei Santos pela coleta dos cones imaturos.

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal e à todos os professores envolvidos no programa, obrigada pela oportunidade e pelos conhecimentos compartilhados.

À Embrapa Florestas por disponibilizar toda a estrutura necessária para o desenvolvimento dessa pesquisa e à Capes, pela bolsa concedida.

À todos os meus amigos que me acompanham nessa jornada chamada vida: vocês são essenciais e insubstituíveis, amo vocês!

Às minhas companheiras de Embrapa, em especial à Laudiane, que me auxiliou desde o início, sempre solícita a me ajudar e esclarecer dúvidas e sempre disposta a ter uma conversa amiga, e à Janaína que é muito mais do que a técnica de laboratório, sempre aberta para ouvir minhas tristezas e alegrias da vida.

À Fabrícia por disponibilizar muito do seu tempo para me auxiliar na anatomia, estando sempre de bom humor para tornar tudo mais fácil.

À Vanessa, Melrian e Paulo, meus amigos e companheiros de disciplinas, obrigada pela amizade e pelas risadas. Amizades que quero levar para sempre! Agradeço em especial à Vanessa por me ajudar pacientemente na parte de estatística.

À todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu desenvolvimento pessoal e profissional,

Muito obrigada!

*“Descobri que não há nada melhor para o homem do que ser feliz e praticar o bem enquanto vive.”*

*Eclesiastes 3:12*

## RESUMO

*Pinus caribaea* var. *hondurensis* é a espécie de *Pinus* tropical que melhor se adaptou no Brasil e tem se apresentado como o melhor produtor de madeira para celulose entre as espécies tropicais. A embriogênese somática é um processo em que se obtém novos embriões originados a partir de células somáticas, sem a fusão de gametas. Essa técnica permite a propagação clonal de coníferas devido à sua alta produtividade e homogeneidade do material obtido. O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Como objetivos específicos, foram testadas duas composições salinas de meios de cultura na indução da embriogênese somática, sendo eles LOB e QL, com e sem adição de ácido fólico e diferentes explantes, sendo eles, embriões zigóticos maduros e imaturos. Além disso, foi analisada a influência do genótipo e a data de coleta dos embriões zigóticos imaturos para a formação de massas pró-embriogênicas. Análises histológicas foram realizadas para avaliação do potencial embriogênico das culturas. Para as etapas de indução e pré-maturação da embriogênese somática, os meios de cultura foram suplementados com tiamina-HCl, glutamina, caseína hidrolisada, glicina, mio-inositol e sacarose em diferentes concentrações para cada meio de cultura e para cada fase de desenvolvimento, além de reguladores de crescimento (2,4-D, BAP, AIB, ABA e cinetina). A fase de indução durou de 60 a 90 dias e após esse período as massas pró-embriogênicas foram transferidas para meio de cultura de pré-maturação por 45 dias. Em todas as etapas as culturas foram mantidas em BOD, no escuro, com temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sendo realizados subcultivos periódicos a cada 21 dias. A cada subcultivo foi retirada uma amostra de três explantes, aleatoriamente, para análise da capacidade embriogênica, utilizando a coloração de carmim acético 2% e azul de Evans. Como resultado, os embriões maduros não apresentaram formação de massas pró-embriogênicas. Já para os embriões zigóticos imaturos foi observada a formação de massas pró-embriogênicas em todas as composições de meios de cultura avaliados. Para a análise estatística foi aplicado o teste de Levene que constatou que as amostras eram homogêneas. Com isso foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística para a formação de massas pró-embriogênicas entre os meios de cultura analisados. O *Pinus caribaea* var. *hondurensis* apresentou diferença estatística na formação de massas pró-embriogênicas entre as matrizes e entre as datas de coleta. Para a melhor matriz, na melhor data de coleta, foi obtido 40% de formação de massa pró-embriogênica no meio LOB. Avanços na embriogênese somática para essa espécie foram obtidos com o presente estudo, no qual foi observada a formação de embriões somáticos anormais para uma das matrizes analisadas.

**Palavras-chave:** Coníferas; embriões imaturos; embriões maduros; época de coleta; genótipo.

## ABSTRACT

*Pinus caribaea* var. *hondurensis* is the species of tropical *Pinus* best adapted in Brazil and has been presented as the best producer of wood for cellulose among tropical species. Somatic embryogenesis is a process in which new embryos are obtained originating from somatic cells, without the fusion of gametes. This technique allows the clonal propagation of conifers due to their high productivity and homogeneity of the obtained material. The present work had as general purpose the development of a somatic embryogenesis protocol of *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. As specific purposes, two saline compositions of culture media were tested in the induction of somatic embryogenesis, being LOB and QL, with and without addition of folic acid and different explants, being mature and immature zygotic embryos. In addition, the influence of the genotype and the date of collection of the immature zygotic embryos for the formation of pro-embryogenic masses were analyzed. Histological analyzes were performed to evaluate the embryogenic potential of the cultures. For the induction and pre-maturation stages of somatic embryogenesis, culture media were supplemented with thiamine-HCl, glutamine, hydrolyzed casein, glycine, myo-inositol and sucrose at different concentrations for each culture medium and for each development phase, as well as growth regulators (2,4-D, BAP, AIB, ABA and kinetin). The induction phase lasted from 60 to 90 days and after that period the pro-embryogenic masses were transferred to pre-maturation culture medium for 45 days. At all stages cultures were maintained in BOD in the dark, with a temperature of  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , and periodic subcultures were performed every 21 days. Each subculture was randomly sampled three explants for analysis of embryogenic capacity, using 2% acetic carmine and Evans blue staining. As a result, mature embryos did not exhibit pro-embryogenic mass formation. For immature zygotic embryos, the formation of pro-embryogenic masses was observed in all compositions of culture media evaluated. For the statistical analysis, the Levene test was applied, which verified that the samples were homogeneous. Thus, the analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ( $p < 0.05$ ) were performed. There was no statistical difference for the formation of pro-embryogenic masses between the analyzed culture media. *Pinus caribaea* var. *hondurensis* presented a statistical difference in the formation of pro-embryogenic masses between the genotype and between the dates of collection. For the best genotype, at the best collection date, 40% pro-embryogenic mass formation was obtained in the LOB medium. Advances in somatic embryogenesis for this species were obtained with the present study, in which the formation of abnormal somatic embryos was observed for one of the genotypes analyzed.

Key words: Conifers; genotype; immature embryos; mature embryos; time of collection;

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Etapas da embriogênese somática em gimnospermas (*Piceacea*). Abreviaturas: pU – nível primário, pE - nível da embriogênese primária, E – células embriogênicas, S – células do suspensor, EM – culturas embriogênicas, sS – suspensor secundário. (VON ARNOLD et al., 2002). ..... 21
- FIGURA 2: Extrusão da micrópila do gametófito feminino em *Pinus caribaea* var. *hondurensis* ..... 38
- FIGURA 3: Coloração de células pró-embriogênicas com carmim acético e azul de Evans em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*: (A) 1º subcultivo; (B) 3º subcultivo; (C) 5º subcultivo; (D) 6º subcultivo. Diferença entre massa pró-embriogênica e não embriogênica em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*: (E) massa não embriogênica; (F) massa pró-embriogênica. (G) formação de cotilédones em *Pinus caribaea* var. *hondurensis* na fase de maturação. (H) secção histológica de embrião somático anormal de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* tratado com azul de toluidina 5%. ..... 42

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1: Composição e concentração de sais utilizados no meio de cultura QL e LOB para embriogênese somática de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*..... 31
- TABELA 2: Composição dos meios de cultura QL e LOB, utilizados nas diferentes etapas da embriogênese somática de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* ..... 32
- TABELA 3: Efeito das diferentes épocas de coleta na formação de massas pró-embriogênicas utilizando embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. ..... 35
- TABELA 4: Efeito do genótipo na formação de massas pró-embriogênicas utilizando embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. ..... 37
- TABELA 5: Efeito dos diferentes meios de cultura na formação de massas pró-embriogênicas utilizando a média de todos os genótipos em todas as datas de coletas dos embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. ..... 38
- TABELA 6: Efeito dos diferentes meios de cultura na formação de massas pró-embriogênicas utilizando a média das melhores matrizes nas melhores datas de coleta de embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. ..... 39
- TABELA 7: Efeito dos diferentes meios de cultura na formação de massas pró-embriogênicas utilizando a média das melhores datas de coleta de embriões imaturos para cada matriz de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. ..... 40

## LISTA DE ABREVIATURAS

**2,4-D** – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**ABA** – Ácido abscísico

**AIB** – Ácido indol butírico

**BAP** – Benzilaminopurina

**BOD** – Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio)

**FAA** – Solução de formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico

**LOB** – Meio de cultura de TANG e NEWTON (2005)

**PEG** – Polietilenoglicol

**QL** – Meio de cultura de QUOIRIN e LEPOIVRE (1977)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
3.1 <i>Pinus caribaea var. hondurensis</i> .....	17
3.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA .....	18
3.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CONÍFERAS .....	19
3.3.1 Iniciação .....	20
3.3.2 Proliferação .....	22
3.3.3 Maturação e pós-maturação .....	23
3.3.4 Conversão em plantas .....	25
3.3.5 Aclimatização de plântulas somáticas .....	25
3.3.6 Fatores que influenciam na embriogênese somática .....	26
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1 MATERIAL VEGETAL .....	28
4.2 ASSEPSIA E INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	29
4.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA .....	30
4.3.1 Indução da embriogênese somática .....	30
4.3.2 Maturação dos embriões somáticos .....	32
4.3.3 Análises histológicas .....	32
4.3.4 Avaliação do potencial embriogênico .....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	34
5.1 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA .....	34
5.1.1 Efeito do estágio de desenvolvimento de embriões zigóticos na indução de massa pró-embriogênica .....	34
5.1.2 Efeito da época de coleta dos embriões imaturos .....	35
5.1.3 Efeito do genótipo na formação de massa pró-embriogênica .....	36
5.1.4 Efeito dos meios de cultura com e sem adição de ácido fólico .....	37
5.1.5 Avaliação do potencial embriogênico e análise histológica .....	40
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	44
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	45
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

<b>ANEXOS</b> .....	56
ANEXO 1 - Resultado da análise de variância para a interação entre os fatores analisados na formação de massas pró-embriogênicas de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> . .....	56
ANEXO 2 – Resultado da análise de variância dos diferentes meios de cultura na formação de massas pró-embriogênicas utilizando a média das melhores datas de coleta de embriões imaturos para cada matriz de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> . .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

A introdução de espécies do gênero *Pinus* no Brasil se deu a partir do século XIX, quando foram trazidas pelos imigrantes europeus, com finalidade ornamental. Apenas na década de 50 seu plantio passou a ser implementado de forma intensa por meio de incentivos fiscais oferecidos pelo governo (BRACELPA, 2013). As espécies de *Pinus* pertencem a família Pinaceae e possuem, aproximadamente, 100 espécies originárias de regiões da Europa, Ásia, América do Norte e América Central (IBÁ, 2015). Essas espécies são utilizadas para os mais variados fins, entre eles, o processamento mecânico em serrarias, laminados, aglomerados e celulose de fibra longa.

A área plantada de árvores no Brasil totalizou 7,84 milhões de hectares em 2016, sendo a área de *Pinus* de 1,6 milhões de hectares, localizadas principalmente no Paraná e em Santa Catarina (IBÁ, 2017). Entre as espécies de *Pinus* plantadas atualmente no Brasil encontra-se o *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, originário da América Central. A espécie não tolera geada, sendo assim, seu plantio está concentrado nas regiões tropicais. A produção de madeira dessa espécie varia de 21 a 43 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> até o terceiro ano após o plantio, possui rápido crescimento e além de produzir resina em escala comercial, apresenta boa qualidade de madeira (WREGGE et al., 2014).

Com uma demanda cada vez maior por madeira de *Pinus* spp. torna-se indispensável investir em programas de melhoramento genético e no uso de biotecnologias para otimizar e acelerar o processo de seleção de genótipos superiores, que para espécies lenhosas costumam ser de longa duração. Para *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, o melhoramento genético é aplicado com o objetivo de aumentar a produção de madeira e resina visando atender as demandas das indústrias de papel e celulose de fibra longa, de madeira serrada e do setor resinífero (SANTOS et al., 2016).

A embriogênese somática é uma das opções para a multiplicação de espécies de *Pinus*, de forma mais rápida e otimizada, visando diminuir o longo período demandado para o melhoramento genético das espécies. Enquanto está ocorrendo a seleção em campo já é possível efetuar a clonagem em laboratório. Para algumas espécies de *Pinus*, cerca de 60% das sementes produzem culturas embriogênicas e, destes, cerca de 80% formam plantas clonais

adequadas para plantio em campo. Essas taxas são altas o suficiente para aplicação industrial, e particularmente para o desenvolvimento de plantas clonais de alto valor (PARK, 2002). Em contraste com a embriogênese zigótica, a embriogênese somática é um processo assexuado em que células somáticas se diferenciam em embriões somáticos (KARAMI, AGHAVAISI e POUR, 2009). Novos indivíduos são originados de células simples, sem a fusão de gametas, não sendo conectados aos tecidos maternos (HACCIUS, 1978). Existem duas formas diferentes de indução da embriogênese somática: embriogênese somática direta e indireta. A direta ocorre quando uma proliferação mínima ou nula de tecido não organizado precede a formação de embriões, enquanto que na indireta os embriões são formados a partir de uma massa pró-embriogênica (KARAMI, AGHAVAISI e POUR, 2009).

Protocolos já foram desenvolvidos para algumas espécies de *Pinus*, como por exemplo para *Pinus elliottii* (NEWTON et al., 2005), *Pinus radiata* (WALTER et al., 2005), *Pinus nigra* (SALAJOVA et al., 2005), *Pinus taeda* (TANG e NEWTON, 2005) e *Pinus patula* (FORD et al., 2005). Apesar de promissora, a técnica de embriogênese somática em algumas espécies de *Pinus* ainda é escassa e ineficaz, devido principalmente à baixa taxa de indução e de sobrevivência das culturas. Este aspecto pode resultar em pouca ou nenhuma produção de embriões somáticos, além de existir a incapacidade de maturação dos embriões formados resultando em baixa porcentagem de germinação (PULLMAN e BUCHANAN, 2006). Por isso torna-se indispensável o estudo e desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática otimizados para *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protocolo de embriogênese somática para *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Testar dois meios de cultura, sendo eles o meio LOB e QL, com e sem adição de ácido fólico na indução da embriogênese somática.

b) Induzir a embriogênese somática utilizando embriões zigóticos maduros e imaturos como explantes.

c) Analisar a diferença de resposta na formação de massa pró-embriogênica para oito matrizes selecionadas.

d) Determinar a melhor data de coleta de embriões imaturos.

e) Avaliar o potencial embriogênico das culturas mediante análises histológicas e histoquímicas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Pinus caribaea* var. *hondurensis*

Com o passar dos anos, a disponibilidade de madeira de florestas tropicais nativas reduziu drasticamente, não só devido ao uso insustentável de matéria prima para fins comerciais, como também às restrições jurídicas, implementadas à exploração de florestas nativas. Como alternativa para o suprimento de matéria prima para as indústrias de madeira, novas espécies passaram a ser plantadas e comercializadas (TRIANOSKI, 2012).

A introdução de coníferas exóticas no Brasil iniciou-se em 1936 quando o Serviço Florestal do Estado de São Paulo procurou utilizar economicamente as áreas que ocorriam no Estado. Nas regiões Norte e Centro do Estado de São Paulo, onde estão situados os cerrados, as espécies que apresentaram melhor adaptação foram os *Pinus* tropicais, entre eles, *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *Pinus caribaea* var. *caribaea*, *Pinus caribaea* var. *bahamensis*, *Pinus oocarpa* e *Pinus kasiya*. Dentre esses, *Pinus caribaea* var. *hondurensis* apresentou-se como o maior produtor de madeira para celulose (SUASSUNA, 1977).

*Pinus caribaea* é um pinheiro tropical que cresce naturalmente em baixas altitudes. Seu rápido crescimento e madeira de alta qualidade, durabilidade e resistência o torna muito útil para a produção de polpa, papel, papelão e laminados (MALABADI, SILVA e MULGUND, 2011). A espécie *Pinus caribaea* var. *hondurensis* apresenta tronco retilíneo e pode atingir de 20 a 35 metros de altura com diâmetro de 50 cm a 80 cm, podendo chegar até 1 metro. Sua madeira é utilizada para produção de papel, extração de resina e tanino e o óleo foliar é utilizado para banhos medicinais. A espécie se desenvolve melhor em áreas sem geadas em altitude de até cerca de 700 m e que possuam solos mais férteis, com boa drenagem e precipitação anual de 2.000 a 3.000 mm (FAO, 2007). A sua madeira apresenta rápido e vigoroso desenvolvimento inicial e tem cor clara e amarelada (LORENZI et. al., 2003; ALMEIDA, 2011) com densidade variando entre 0,35 e 0,50 g/m<sup>3</sup> e considerada uma boa produtora de resina (CARPANEZZI et al., 1986). No Brasil, *Pinus caribaea* var. *hondurensis* é um dos mais plantados em reflorestamentos nas zonas quentes, indo desde a Amazônia

até a região sudoeste do país, com uma área de mais de 700.000 ha de florestas plantadas com a espécie (AGUIAR, SOUSA e SHIMIZU, 2014).

### 3.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática é uma rota morfogênética que leva à formação de embriões somáticos por meio da cultura de tecidos. Os embriões somáticos são capazes de germinar e produzir plantas, analogamente aos embriões zigóticos. Desde a sua descoberta, a embriogênese somática tornou-se um método de escolha para a propagação clonal de coníferas, devido à sua alta produtividade e a possibilidade de armazenamento criogênico (KLIMASZEWSKA et. al., 2005). Segundo Von Arnold et al. (2002), a embriogênese somática é um processo de regeneração de plantas com várias etapas, iniciando com a formação de massas pró-embriogênicas, seguida pela formação de embriões somáticos, maturação, dessecação e conversão em plantas.

A embriogênese somática é considerada a técnica mais promissora, para a produção em larga escala, de coníferas com genótipos superiores que foram selecionadas em programas de melhoramento genético. Desta forma, a técnica desempenha um papel importante no aumento da produtividade, sustentabilidade e uniformidade nas florestas plantadas (PULLMAN, ZHANG e PHAN, 2003). Para que se cheguem a esses resultados, deve ser levada em consideração não apenas a quantidade de embriões somáticos formados, mas também a sua qualidade (ARONEN, PEHKONEN e RYYNANEN, 2009).

Dentre as utilizações da embriogênese somática está a criopreservação, que proporciona o armazenamento de embriões e massas pró-embriogênicas, por longo período e baixo custo, permitindo que se prossiga com avaliações em campo para seleção de genótipos superiores e posteriormente a recuperação dos clones de maior valor criopreservados (PULLMAN, NAMJOSHI e ZHANG, 2003). Apesar das inúmeras vantagens oferecidas pela embriogênese somática, alguns fatores têm limitado a comercialização de embriões somáticos de *Pinus spp.* Dentre os principais fatores estão: a baixa frequência de iniciação de culturas embriogênicas, que são altamente variáveis entre espécies e entre famílias dentro das espécies; a recalcitrância de alguns genótipos; a baixa

sobrevivência da cultura, resultando em pouca ou nenhuma produção de embriões somáticos; a incapacidade dos embriões em atingirem a plena maturação, resultando em baixa conversão e reduzido vigor das plântulas (PULLMAN et al., 2005).

### 3.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CONÍFERAS.

A embriogênese somática em coníferas é um processo que compreende vários estágios, onde cada um representa desafios diferentes que são dependentes dos resultados obtidos nas etapas anteriores. Essas etapas estão divididas em iniciação, proliferação, maturação, pós-maturação, germinação e conversão em plantas e início de crescimento *ex vitro* (KLIMASZEWSKA e CYR, 2002).

Muito já foi realizado em estudos com espécies como *Pinus taeda* L. e *Pinus radiata* D. Don. com protocolos de embriogênese somática já desenvolvidos. Porém, esses protocolos nem sempre são aplicáveis para todas as espécies de *Pinus*, havendo a necessidade de protocolos otimizados para as diferentes espécies (GARIN et. al., 2000). Protocolos de embriogênese somática já foram publicados para o *Pinus elliottii* (NEWTON et. al., 2005), *Pinus radiata* (WALTER et. al., 2005), *Pinus nigra* ARN (SALAJOVA et. al., 2005), *Pinus taeda* (TANG e NEWTON, 2005), *Pinus densiflora* Ziebe et Zucc (MARUYAMA, HOSOI, ISHII, 2005) e *Pinus patula* (FORD et. al., 2005).

A embriogênese somática em *Pinus caribaeae* var. *hondurensis*, com a utilização de embriões zigóticos imaturos, foi testada pela primeira vez por Laine e David (1990), porém a técnica ainda necessita ser aperfeiçoada e otimizada para que se consigam embriões somáticos de qualidade. A embriogênese somática em *Pinus caribaeae* já foi relatada por NEUTELINGS et al. (1998) e MALABADI et al. (2011), por NUNES et al. (2017) para o híbrido *Pinus elliottii* x *Pinus caribaeae* e por ZANELLA (2016) para o *Pinus caribaeae* var. *hondurensis*.

A frequência de maturação e a qualidade dos embriões somáticos produzidos são os critérios mais importantes para a otimização de um protocolo de embriogênese somática. Embriões somáticos de qualidade devem se apresentar bioquímica e morfológicamente semelhantes aos embriões zigóticos (MARUYAMA, HOSOI e ISHII, 2007). Observou-se também que as

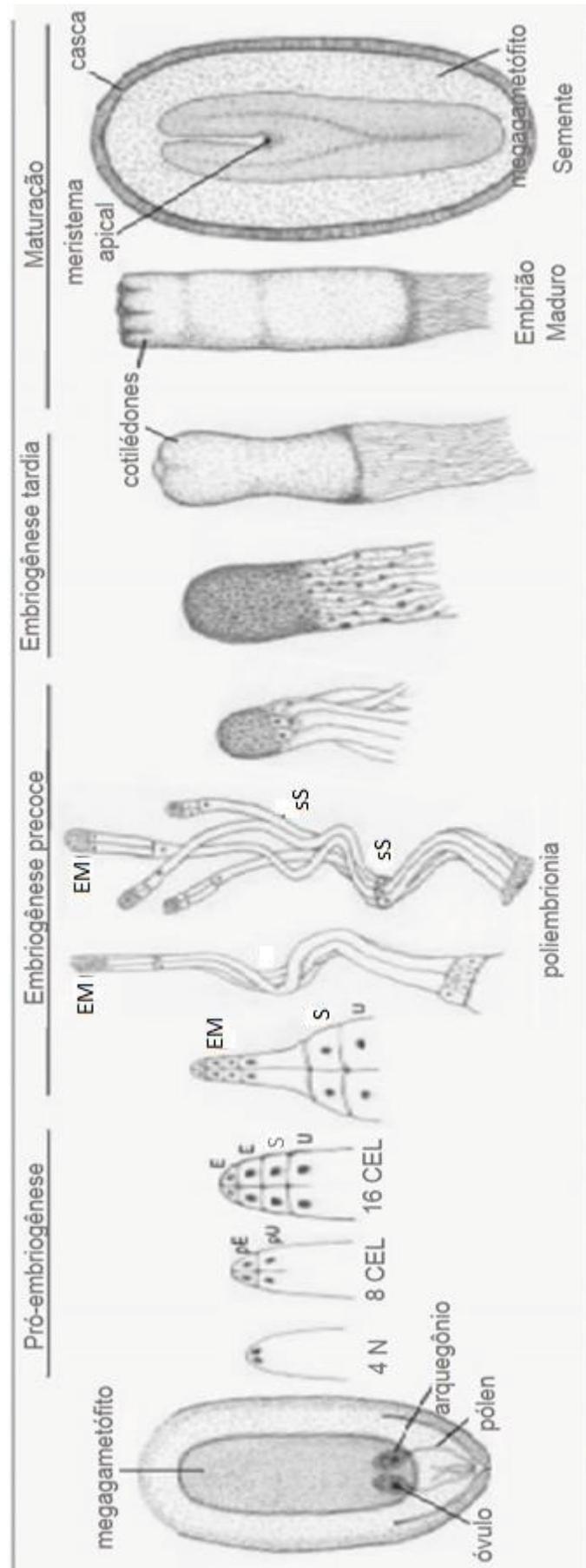
gimnospermas são, em geral, mais recalcitrantes à embriogênese somática que as angiospermas. Para as gimnospermas, a embriogênese somática, muitas vezes, ocorre apenas com a utilização de sementes imaturas com embriões zigóticos em estágios iniciais como explante, como por exemplo para *Pinus taeda* e *Pinus rigida* x *Pinus taeda* (DIAS, 2013).

A comercialização de produtos advindos da embriogênese somática de coníferas, a longo prazo, é dependente do desenvolvimento de um sistema de produção confiável e de baixo custo (CYR e KLIMASZEWSKA, 2002). A baixa maturação de embriões somáticos e a dificuldade de recuperação, em grande número de plantas, representam ainda fatores limitantes para a aplicação em larga escala comercial da embriogênese somática de espécies coníferas, particularmente para algumas espécies de *Pinus* (GARIN et. al., 2000).

### 3.3.1 Iniciação

Uma seleção criteriosa do explante é fundamental para a iniciação da embriogênese somática, tendo o início do tecido embriogênico em coníferas geralmente obtido a partir de tecido juvenil (STASOLLA et. al., 2002). As culturas embriogênicas, iniciadas a partir de embriões zigóticos imaturos, são resultantes de uma continuação do processo de maturação dos embriões zigóticos (VON ARNOLD et al., 2011; NUNES et al., 2017) (FIGURA 1).

FIGURA 1 - Etapas da embriogênese somática em gimnospermas (*Piceaceae*). Abreviaturas: pU – nível primário, pE – nível da embriogênese primária, E – células embriogênicas, S – células do suspensor, EM – culturas embriogênicas, sS – suspensor secundário. (VON ARNOLD et al., 2002).



Para *Pinus taeda*, a iniciação da embriogênese somática ocorre em três etapas. Dentro de 1 a 4 semanas após a inoculação do explante em meio de cultura ocorre a extrusão da micrópila com início da formação das massas pró-embriogênicas. Entre 5 e 7 semanas, os embriões somáticos começam a se formar nas massas pró-embriogênicas formadas a partir de embriões zigóticos. Os embriões somáticos então continuam em um processo de multiplicação nas massas pró-embriogênicas. Essas fases podem ser avaliadas como porcentagem de formação de massas pró-embriogênicas e porcentagem de explantes formando três ou mais embriões somáticos visíveis em microscópio (PULLMAN e JOHNSON, 2002).

A frequência de iniciação da embriogênese somática a partir de gametófitos femininos contendo embriões imaturos, além de outros fatores como genótipo do indivíduo, depende fortemente da fase de desenvolvimento dos embriões zigóticos. Nesta etapa inicial, as culturas não necessitam de luminosidade e normalmente são colocadas no escuro entre 22 e 25°C. O estágio final da etapa de iniciação é marcado pelo visível crescimento do tecido embriogênico do explante, composto pelo início dos embriões somáticos, células individuais e agregados de células (KLIMASZEWSKA e CYR, 2002).

### 3.3.2 Proliferação

A etapa de proliferação compreende o estabelecimento de culturas embriogênicas e seu contínuo crescimento, com o aumento da massa fresca, por meio de subcultivos periódicos em um meio semi-sólido ou meio líquido. Geralmente é utilizada a mesma composição de meio de cultura da fase de iniciação, variando de espécie para espécie (KLIMASZEWSKA e CYR, 2002). Nesta fase, os tecidos embriogênicos podem assumir aparências diferentes. Em algumas linhagens, é possível observar embriões imaturos mais proeminentes, constituídos por um pequeno grupo de células apicais que são subtendidas por células de suspensor de forma alongada e vacuolada, geralmente desprovidas de amido (YEUNG e THORPE, 2005).

O intervalo entre subcultivos também tem um grande impacto na proliferação de massa pró-embriogênica e formação de embriões somáticos (HUSSEIN, IBRAHIM e KIONG, 2006). Nesta fase, o material embriogênico

gerado pode ser criopreservado, ou, se não criopreservado, o tecido embriogênico deve ser subcultivado para um meio fresco a cada 12 a 21 dias. Esta fase também não necessita de luminosidade (KLIMASZEWSKA e CYR, 2002).

### 3.3.3 Maturação e pós-maturação

O processo de maturação é iniciado com o desenvolvimento dos embriões somáticos e termina com a pós-maturação, etapa na qual o embrião atinge a maturidade fisiológica, antes da conversão. Para que a maturação seja completa, os embriões devem se apresentar morfológica e fisiologicamente aptos (STASOLLA e YEUNG, 2003). Normalmente, para obter a maturação de embriões somáticos, as culturas embriogênicas contendo os embriões somáticos precisam ser transferidas para um meio de cultura suplementado com ABA, PEG e carvão ativado. O ABA impede a conversão precoce dos embriões, o PEG estimula a maturação dos embriões somáticos por meio da regulação do seu potencial osmótico e o carvão ativado adsorve compostos prejudiciais aos embriões e promove a maturação de embriões somáticos (NEWTON, TANG e JAIN, 2005).

Esta fase da embriogênese somática normalmente ocorre sob baixa intensidade de luminosidade e fotoperíodo de 16 horas. Alguns protocolos contém uma etapa de pré-maturação, que envolve um breve cultivo do tecido embriogênico (3 a 7 dias) em um meio desprovido de reguladores de crescimento e contendo carvão ativado, antes da transferência para um meio de maturação. O meio pode ser líquido ou semi-sólido (KLIMASZEWSKA e CYR, 2002). Esta etapa de pré-maturação ajuda a reduzir a quantidade de auxina presente nas culturas embriogênicas (YEUNG e THORPE, 2005). Um dos eventos mais importantes ocorridos durante a maturação dos embriões somáticos é a diferenciação do meristema apical, na qual os embriões são submetidos a diversas alterações morfológicas e bioquímicas (HUSSEIN, IBRAHIM e KIONG, 2006).

Para *Picea abies*, após uma semana na presença de meio de cultura suplementado com ABA, o aumento da atividade meristemática dentro da massa embrionária, resulta em um pequeno embrião globular amarelo claro, envolvido

por uma camada de células translúcidas e vacuoladas. Na segunda semana, a atividade mitótica contínua, especialmente na extremidade basal do embrião adjacente ao suspensor, resultando na elevação do embrião acima da massa pró-embriogênica. Com isso, o embrião continua a se expandir em comprimento e circunferência permanecendo fixo às células de suspensor. Na terceira semana é possível observar a formação do meristema apical, procâmbio e início de cotilédones. Na quarta semana, os embriões continuam a crescer e expandir, e o desenvolvimento de cotilédones é evidente. Nesta fase geralmente é desenvolvida uma área de apoptose entre as células de suspensor e o embrião, podendo separá-los facilmente (YEUNG e THORPE, 2005). Na primeira e segunda semana do embrião em meio contendo ABA, ocorre a produção e armazenamento de polissacarídeos no interior do embrião enquanto, que na terceira e quarta semana, ocorrem o acúmulo de lipídios e proteínas (YEUNG e THORPE, 2005).

A fase de pós-maturação é caracterizada pela desidratação parcial e aclimatização dos embriões somáticos. Sem isso, os embriões somáticos, muitas vezes, não conseguem formar meristemas funcionais durante o crescimento e as plântulas resultantes têm uma menor taxa de sobrevivência (TANG e NEWTON, 2005). Os embriões somáticos maduros podem ser parcialmente desidratados, iniciando com uma umidade relativa do ar elevada de 98% e a reduzindo gradualmente, visando diminuir a quantidade de água antes da conversão (KLIMASZEWSKA e CYR, 2002).

A taxa de conversão de embriões somáticos maduros em plântulas é geralmente otimizada pela desidratação parcial, antes da transferência de embriões somáticos para o meio de conversão. Nesta fase, o crescimento e o desenvolvimento anatômico de embriões somáticos já foram concluídos, e ocorre uma diminuição nos níveis de ABA endógeno e no teor de água dentro dos embriões, iniciando o processo de conversão dos embriões somáticos (VAGNER et al., 2005). No entanto, a dessecação parcial não é necessária, no final do período de maturação, se o teor de água dos embriões somáticos maduros for suficientemente baixo. Isto pode ocorrer em meios de cultura que contenham concentração mais elevada de agentes geleificantes do que as concentrações convencionais. Neste caso, os embriões somáticos maduros

resultantes são caracterizados por uma alta taxa de conversão para plantas fenotipicamente normais (KLIMASZEWSKA e CYR, 2002).

#### 3.3.4 Conversão em plantas

Para a conversão em plântulas, os embriões somáticos normalmente são inoculados *in vitro*, em meio semi-sólido contendo sacarose e podendo ou não conter uma fonte de nitrogênio orgânico e carvão ativado. Esta etapa é concluída após o alongamento do epicótilo e o desenvolvimento de acículas, que ocorrem normalmente após 12 a 16 semanas após a inoculação do explante no meio de cultura, dependendo da espécie. O meio de cultura utilizado varia de espécie para espécie e a intensidade luminosa é menor nas duas primeiras semanas de conversão, sendo gradualmente aumentada durante o crescimento das plântulas (KLIMASZEWSKA e CYR, 2002).

A qualidade de maturação do embrião somático é um fator essencial para o enraizamento e a conversão em plântulas (MATUYAMA, HOSHOI e ISHII, 2007). Para algumas espécies de pinus, um embrião somático de qualidade é definido como uma estrutura bipolar com um mínimo de três cotilédones distintos (THOMPSON e HARRINGTON, 2005).

#### 3.3.5 Aclimatização de plântulas somáticas

A transferência das plântulas para condições *ex vitro* é necessária não apenas para promover a autotrofia da planta, mas também para ajudá-la na transição de um ambiente com altos níveis de umidade relativa do ar e baixos níveis de luminosidade no meio de cultura para um ambiente com menor umidade relativa e níveis mais altos de luminosidade *ex vitro*. Esta etapa geralmente é realizada em uma estufa ou estufim equipado com um sistema de nebulização ou névoa (THOMPSON e HARRINGTON, 2005).

O estabelecimento das plântulas desenvolvidas via embriogênese somática *in vitro* é realizado em substratos, sob condições controladas na casa de vegetação, com umidade relativa elevada durante as duas a três primeiras semanas de crescimento, para facilitar a aclimatização das plântulas (KLIMASZEWSKA e CYR, 2002). Durante as primeiras semanas, após a

transferência *ex vitro*, é necessário evitar altas temperaturas de cultivo. Depois que as plantas crescem e os sistemas radiculares estão bem desenvolvidos, é iniciada a aclimatização em temperatura ambiente. As plantas bem aclimatizadas podem então ser transferidas para o campo (VAGNER et al., 2005).

### 3.3.6 Fatores que influenciam na embriogênese somática

A embriogênese somática é influenciada por vários fatores, entre eles, a fase de desenvolvimento de embriões zigóticos, o genótipo, a formulação do meio de cultura e o tipo de explante (PARK et al, 1998). Dentre os fatores citados anteriormente, os mais importantes são a fase de desenvolvimento dos embriões zigóticos e tipo de explante, pois diferentes explantes em diferentes estágios de desenvolvimento diferem na sua capacidade de resposta *in vitro* (MALABADI, CHOUDHURY e TANDON, 2004).

Os explantes mais utilizados, para a indução da embriogênese somática em coníferas, são os megagametófitos femininos contendo o embrião zigótico. Embora seja o mais indicado, o uso de embriões zigóticos como explantes oferece desvantagens, como a heterogeneidade, devido à polinização cruzada, o que conduz à geração de plantas com caracteres inferiores (GARIN, ISABEL e PLOURDE, 1998). No entanto, a heterogeneidade, proveniente da utilização de embriões zigóticos como explante, poderia ser solucionada ao se realizar polinização controlada, onde seriam selecionados progenitores femininos e masculinos favoráveis (PARK et al., 2006). As desvantagens associadas aos explantes zigóticos podem ser amplamente superadas ao se utilizar como explantes acículas ou raízes provenientes da matriz selecionada, pois os explantes seriam idênticos à planta matriz (GARIN, ISABEL e PLOURDE, 1998).

O estágio de desenvolvimento do embrião zigótico é criticamente importante, especialmente para as coníferas. Para *Pinus strobus*, por exemplo, a fase mais adequada para a coleta dos embriões zigóticos imaturos é logo após a fertilização, ou seja, a fase pré e pós-clivagem, antes do aparecimento de um embrião dominante (PARK, 2002). De forma geral, embriões zigóticos imaturos na fase precotiledonar são os mais responsivos para a indução da embriogênese somática em coníferas (GARIN, ISABEL e PLOURDE, 1998). A identificação do

estágio de desenvolvimento adequado do embrião zigótico imaturo, para iniciar uma cultura de embriões somáticos, é de suma importância, pois a coleta é, muitas vezes, restrita a uma pequena janela de tempo anual (CARNEROS et al., 2009).

Outro fator que influencia diretamente a indução da embriogênese somática em coníferas são os meios de cultura utilizados. Os ambientes nutricionais, osmóticos e hormonais para o desenvolvimento de embriões somáticos já são conhecidos, entretanto, é necessário otimizar esses ambientes para o desenvolvimento de embriões somáticos vigorosos e de alta qualidade (PULLMAN et al., 2003). Não é provável que seja encontrado um meio de cultura universal, que seja adequado para todas as coníferas, pois diferentes genótipos respondem de formas diferentes ao tipo e concentração de reguladores vegetais, sais e suas combinações (PARK et al., 2006).

Em coníferas, a adição de reguladores de crescimento vegetal pode ser utilizada para induzir e manter uma cultura embriogênica *in vitro*, resultando na formação de embriões somáticos maduros (AQUEA e ARCE-JOHNSON, 2008). A disponibilidade de água do meio de cultura, para a iniciação das culturas embriogênicas, também desempenha um papel importante, posteriormente, na etapa de maturação dos embriões somáticos (MALABADI, CHOUDHURY e TANDON, 2004).

Reguladores de crescimento vegetal, como auxinas e citocininas, desempenham um papel importante na iniciação de culturas embriogênicas e sua proliferação, sendo os reguladores mais utilizados o 2,4-D e o BAP (PARK et al., 2006). A presença de auxina e citocinina no meio de cultura, é frequentemente associada à produção de estresse oxidativo, e o mecanismo de defesa a esse estresse pode induzir à formação de embriões somáticos (AQUEA e ARCE-JOHNSON, 2008). Além de que, as auxinas e citocininas são as principais responsáveis pela regulação da divisão e diferenciação celular na embriogênese somática (FEHÉR et al., 2003).

A adição de vitaminas ao meio de cultura também pode ser utilizada, como por exemplo, o ácido fólico. O ácido fólico pode melhorar o crescimento de plântulas na fase de conversão dos embriões somáticos, pois é um importante doador de carbono, e participa da síntese de proteínas e aminoácidos do embrião somático (PULLMAN et al., 2005). Na fase de maturação dos embriões

somáticos, os constituintes do meio de cultura, particularmente agentes osmóticos, o promotor de maturação e o tipo de geleificante, têm um efeito importante na maturação de embriões somáticos (MALABADI, CHOUDHURY e TANDON, 2004).

Para a maturação dos embriões somáticos, as auxinas e citocininas são retiradas, e normalmente, é acrescentado ABA ao meio de cultura como promotor da maturação dos embriões somáticos (CARNEROS et al., 2009). O ABA, por sua vez, é responsável pelo desenvolvimento do embrião por meio da inibição da clivagem poliembriônica e o acúmulo de substâncias de reserva (DODEMAN et al., 1997). O polietilenoglicol (PEG) é utilizado como agente osmótico e promove o acúmulo de reservas de nutrientes nos embriões somáticos (LEAL et al., 1995).

Para se obter melhores resultados na embriogênese somática, devem ser estudadas diferentes composições de meios de cultura e reguladores vegetais, em conjunto com a utilização de vários genótipos, em diferentes fases de desenvolvimento do embrião zigótico (KLIMASZEWSKA et al., 2001).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAL VEGETAL**

Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Florestas, localizada em Colombo-PR.

Foram utilizadas sementes maduras de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* colhidas em 2009 em Ventania-PR, armazenadas a 4°C e cedidas pelo Laboratório de Sementes Florestais da Embrapa Florestas.

As sementes imaturas utilizadas são provenientes de um teste de progênes instalada em 16 de junho de 1986, na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (PEFE), da Faculdade de Engenharia - Câmpus de Ilha Solteira - da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, localizada no município de Selvíria, MS. A PEFE encontra-se na latitude 20°20'S, longitude 51°23'W e altitude de 370 metros do nível do mar, com clima do tipo Aw, pela classificação de Köppen, apresentando temperatura média anual de 24,5°C,

precipitação pluviométrica média anual de 1.232,2 mm, umidade média anual de 64,8% e insolação média de 7,3 horas/dia (SANTOS, 2014).

Os cones imaturos foram coletados, quinzenalmente, de oito matrizes selecionadas de bordadura, no período de 15 de outubro de 2016 à 15 de janeiro de 2017, totalizando seis coletas (Coleta 1: 17/10/2016; Coleta 2: 03/11/2016; Coleta 3: 21/11/2016; Coleta 4: 06/12/2016; Coleta 5: 26/12/2016; Coleta 6: 16/01/2017).

As pinhas foram enviadas para a Embrapa Florestas em Colombo-PR, em caixa de isopor e separadas por matriz, não ultrapassando dois dias de transporte desde a sua coleta. Assim que recebidas foram armazenadas na geladeira e no dia seguinte foi realizada a extração das sementes das pinhas e armazenadas, por no máximo uma semana, na geladeira até a utilização para indução da embriogênese somática.

#### 4.2 ASSEPSIA E INTRODUÇÃO *IN VITRO*

Para a assepsia, as sementes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* foram inicialmente mantidas em água corrente por 30 minutos, sendo as etapas subsequentes realizadas em câmara de fluxo laminar, na qual as sementes foram desinfestadas por meio de imersão em etanol 70% por 50 segundos, seguida pela imersão em solução de cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) a 0,1% por 20 minutos, em agitação, e em seguida lavadas três vezes com água deionizada autoclavada.

Após a assepsia, o isolamento do gametófito feminino (endosperma contendo o embrião zigótico) foi realizado em fluxo laminar, utilizando-se bisturi e pinça para a remoção do tegumento da semente. Em seguida, o explante foi inoculado em placa de Petri, de 92 mm x 16 mm, contendo 25 mL de meio de cultura.

### 4.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

#### 4.3.1 Indução da embriogênese somática

Os gametófitos femininos foram inoculados em quatro composições de meios de cultura, sendo eles LOB (TANG e NEWTON, 2005), LOB com adição de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de ácido fólico, QL (QUOIRIN E LEPOIVRE, 1977) e QL com adição de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de ácido fólico (TABELA 1). Os meios QL e LOB foram suplementados com glutamina, caseína hidrolisada, mio-inositol, sacarose, ágar, 2,4-D e BAP. Além dos componentes citados anteriormente que foram comuns aos dois meios, ao meio QL foi acrescentado tiamina-HCl e glicina, e ao meio LOB, cinetina e AIB (TABELA 2).

Os meios de cultura tiveram o pH ajustado em 5,8 e posteriormente foram esterilizados em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Os explantes foram inoculados em placas de Petri (92mm x 16mm), contendo 25mL de meio de cultura de indução (TABELA 2), sendo realizados subcultivos para meio fresco a cada 21 dias.

O delineamento experimental utilizado para os embriões imaturos foi o inteiramente casualizado, com um arranjo trifatorial, no qual foram considerados os meios (QL e LOB) com e sem adição de ácido fólico, diferentes matrizes (1 à 8) e seis datas de coletas distintas. Cada unidade experimental consistiu de 10 explantes por matriz, por meio de cultura e por data de coleta, tendo duas repetições cada.

Para os embriões maduros o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos, onde foram considerados os meios de cultura utilizados (LOB e QL) com e sem adição de ácido fólico. Cada unidade experimental consistiu de 10 explantes, tendo dez repetições.

As culturas foram mantidas em estufa tipo BOD, na ausência de luz, em uma temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , até que fosse observado o início de formação de embriões somáticos, que ocorreu entre 60 e 90 dias após a inoculação do explante em meio de cultura. Após esse período a massa pró-embriogênica foi transferida para o meio de pré-maturação no qual permaneceu por 45 dias (TABELA 2).

A partir do 3° subcultivo (63° dia) foi avaliada a formação de massa pró-embriogênica nos explantes de gametófitos femininos. Os dados obtidos foram transformados conforme a equação  $(\sqrt{x} + 0,5)$  para normalizar os resíduos e estabilizar sua variância e posteriormente foram submetidos ao teste de Levene, ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando o programa IBM® SPSS ( $p < 0,05$ ). Para a análise estatística do efeito da época de coleta dos embriões zigóticos imaturos, foi calculada uma média de formação de massa pró-embriogênica entre as oito matrizes analisadas para cada data de coleta. Para a análise estatística do efeito do genótipo foi realizada uma média de formação de massa pró-embriogênica por matriz nas cinco datas de coleta nos quatro meios de cultura utilizados. Para a análise estatística do efeito do meio de cultura, foi utilizada uma média da formação de massa pró-embriogênica entre as épocas de coleta e as matrizes para cada meio de cultura.

TABELA 1: : Composição e concentração de sais utilizados no meio de cultura QL e LOB para embriogênese somática de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*

Sais	QL (mg L <sup>-1</sup> )	LOB (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Macronutrientes</b>		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	578,920	1900,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	270,000	170,000
KNO <sub>3</sub>	1800,000	720,000
MgSO <sub>4</sub>	175,790	370,000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400,000	400,000
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	440,000
<b>Micronutrientes</b>		
KCl	-	250,000
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,800	27,800
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,300	-
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
FeNaEDTA	-	37,300
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200	6,200
KI	0,080	0,830
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,760	25,350
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,250	0,250
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,600	25,800

TABELA 2: Composição dos meios de cultura QL e LOB, utilizados nas diferentes etapas da embriogênese somática de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*

Componentes (g L <sup>-1</sup> )	Meio de indução e proliferação		Meio de pré-maturação	
	QL	LOB	QL	LOB
Sais				
Tiamina HCl	0,04	-	0,04	-
Glutamina	1,00	0,50	1,00	0,30
Caseína hidrolisada	1,00	0,50	1,00	0,30
Glicina	1,00	-	1,00	-
Mio-inositol	0,50	0,50	0,50	0,30
Ácido fólico	0,10	0,10	0,10	0,10
Sacarose	30,00	30,00	30,00	20,00
Ágar	7,00	7,00	7,00	7,00
Carvão ativado	-	-	1,50	-
PEG 6000	-	-	-	-
Reguladores vegetais (µM)				
Cinetina	-	4,00	-	0,40
2,4-D	10,00	10,00	-	1,00
BAP	4,00	4,00	-	0,40
ABA	-	-	-	-
AIB	-	5,00	-	0,50

#### 4.3.2 Maturação dos embriões somáticos

Após a formação dos embriões somáticos imaturos, eles foram mantidos nas massas pró-embriogênicas por 45 dias em BOD, no escuro, com temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , em placas de Petri de 92 mm x 16 mm contendo 25 mL de meio de cultura de pré-maturação, conforme descrito na Tabela 2. Após esse período, os embriões somáticos foram utilizados para análises histológicas.

#### 4.3.3 Análises histológicas

Foram realizadas análises histológicas das massas pró-embriogênicas em desenvolvimento inicial e quando apresentavam sinais de oxidação. A análise também foi realizada em embriões somáticos, após 45 dias de cultivo no meio de cultura de pré-maturação.

O material vegetal foi fixado em FAA 50% (formaldeído 37%, ácido acético glacial e álcool etílico 50% (1:1:18)) por 24 horas (JOHANSEN, 1940). Após esse

período, as amostras foram desidratadas em série etílica (50, 60, 70, 80 e 90%) por uma hora cada, e conservadas em álcool etílico 70%.

Para realização das secções histológicas, as amostras foram pré infiltradas por 48 horas (50% álcool e 50% resina), infiltradas e emblocadas em Historesina Leica®, seguindo as instruções do fabricante. Para as secções, foi utilizado um micrótomo rotativo manual Olympus CUT 4055, os blocos foram seccionados longitudinalmente com espessura de 10 µm e fixados em lâminas para microscópio de 26mm x 76mm. Para a visualização da formação estrutural das massas pró-embriogênicas e dos embriões somáticos, as secções foram tratadas com azul de toluidina 5% por 3 min e posteriormente lavados 2 vezes em água, para retirada do excesso de corante. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Zeiss® e as imagens foram capturadas por câmera fotográfica acoplada ao mesmo microscópio pertencente ao Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal no Departamento de Botânica na UFPR.

#### 4.3.4 Avaliação do potencial embriogênico

Quando se iniciou a formação da massa pró-embriogênica, uma amostra dessa massa foi retirada de três explantes, aleatoriamente, a cada subcultivo (21, 42, 63, 84, 105, 126 e 147 dias), totalizando 21 amostras para análise do potencial embriogênico ao longo dos subcultivos. As amostras foram inseridas em lâminas histológicas de 26mm x 76mm e coradas com carmim acético 2% por 1 minuto e lavadas com água destilada, para retirar o excesso de corante. Em seguida, a amostra foi corada com azul de Evans 0,1% por 30 segundos e lavada com água destilada (GUERRA e NODARI, 2006). As células foram visualizadas em microscópio estereoscópio (Micronal®) e as imagens capturadas em uma câmera fotográfica acoplada no mesmo microscópio pertencente ao Laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA Florestas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores coleta x meio de cultura x matriz, coleta x meio, coleta x matriz, meio x matriz, houve apenas a interação entre os fatores coleta e matriz (ANEXO1).

#### 5.1.1 Efeito do estágio de desenvolvimento de embriões zigóticos na indução de massa pró-embriogênica

A partir do 3º subcultivo (63º dia), foi avaliada a indução de massa pró-embriogênica nos explantes de gametófitos femininos contendo os embriões maduros e imaturos, e constatou-se que nos embriões maduros não houve formação da massa, ocorrendo apenas nos embriões zigóticos imaturos.

Diferentemente do observado no presente trabalho com *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, foi possível completar todas as etapas da embriogênese somática em *Pinus caribaea* (iniciação, proliferação, maturação e conversão) com a utilização de embriões zigóticos maduros (MALABADI, SILVA e MULGUND, 2011). Em outras espécies de coníferas, como para *Picea glauca* e *Pinus oocarpa*, também foi possível obter embriões somáticos normais utilizando o embrião maduro como explante (GUPTA et al, 1986; ATREE et al., 1993; JAIN, et al., 1995; CHAVEZ et al., 2011).

Uma possível causa para a não formação da massa pró-embriogênica é o longo tempo de armazenamento das sementes, que foram coletadas em 2009, ocasionando a perda de potencial embriogênico dos embriões. As frequências de iniciação relatadas para explantes de sementes maduras são muito baixas para aplicação prática (KLIMASZEWSKA et al., 2007).

Sendo assim, para as análises realizadas na sequência do trabalho, foram considerados os resultados obtidos a partir, somente, dos embriões imaturos.

### 5.1.2 Efeito da época de coleta dos embriões imaturos

Para a análise, a coleta 1 (17/10/2016) foi descartada por não haver formação de massa pró-embriogênica para nenhuma das oito matrizes em nenhum dos meios de cultura testados.

Houve diferença estatística entre as diferentes datas de coleta sendo as melhores épocas a coleta do dia 26/12/2016 e do dia 06/12/2016, com 12% e 10% de formação de massas pró-embriogênicas, respectivamente (TABELA 3).

TABELA 3: Efeito das diferentes épocas de coleta na formação de massas pró-embriogênicas utilizando embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

Coleta	Formação de massas pró-embriogênicas (%)
03/11/2016	1,00 c
21/11/2016	1,00 c
06/12/2016	10,00 ab
26/12/2016	12,00 a
16/01/2017	3,00 bc

As variâncias foram homogêneas pelo teste de Levene. As médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A data de coleta, que reflete o estágio de desenvolvimento do embrião, é muito importante para a indução da embriogênese somática em todas as espécies de *Pinus*. Para *Pinus strobus*, com sementes coletadas em Nova Escócia, Canadá, as datas de coleta tiveram um grande impacto sobre a iniciação de massas pró-embriogênicas, tendo 6,3% de resposta na primeira coleta (28 de junho, verão) e 52,9% na segunda coleta, uma semana após a primeira (05 de julho, verão) vindo a declinar nas coletas subsequentes (KLIMASZEWSKA et al., 2001). Isto demonstra que além da janela para a coleta dos embriões imaturos ser muito pequena, a época de coleta difere entre as espécies de *Pinus* e entre diferentes longitudes, que para o presente trabalho, foi entre 06 de dezembro e 26 de dezembro (verão) (Tabela 3).

O tamanho dos embriões e seus estádios de desenvolvimento podem diferir mesmo entre as sementes de uma única árvore, devido à polinização aberta. Sendo assim, o tamanho, a morfologia e o estágio de desenvolvimento do embrião também devem ser considerados como parâmetros para a seleção de embriões responsivos (ARYA, KALIA e ARYA, 2000).

Quando as coletas são efetuadas em estágio de desenvolvimento apropriado, o gametófito feminino pode fornecer os nutrientes necessários para a iniciação da embriogênese somática *in vitro*, sem a necessidade de suplementar o meio de cultura com auxinas e citocininas exógenas (MARUYAMA, HOSOI e ISHII, 2007). A coleta no estágio de desenvolvimento ideal pode resultar em altas taxas de iniciação de culturas embriogênicas (PARK, 2002).

### 5.1.3 Efeito do genótipo na formação de massa pró-embriogênica

Foi avaliada a formação de massa pró-embriogênica nas oito matrizes utilizadas no experimento. Conforme observado na TABELA 4, houve formação de massa pró-embriogênica para todas as matrizes, porém com diferença significativa entre elas. A maior porcentagem de formação foi para a matriz cinco, não diferindo estatisticamente da matriz três, dois e sete com 16, 14, 5 e 4%, respectivamente. As matrizes quatro e oito apresentaram as menores porcentagens de formação de massa pró-embriogênica, com 2% e 1%, respectivamente. Embora as matrizes cinco e três não tenham diferido estatisticamente para a formação de massa pró-embriogênica, a formação de embriões foi observada apenas para a matriz cinco.

Resultados semelhantes aos apresentados no presente trabalho foram encontrados em literatura. Nem todos os genótipos de embriões imaturos de *Pinus taeda* responderam da mesma maneira, pois uma das famílias avaliadas foi recalcitrante e não produziu massa pró-embriogênica em nenhum dos meios de cultura analisados (PULMANN et al., 2005). Para *Pinus sylvestris* as frequências de iniciação de massas pró-embriogênicas variaram de 0 a 30% nas diferentes matrizes avaliadas, porém não apresentou diferença estatística na fase de proliferação (ARONEN, PEHKONEN e RYNANEN, 2009).

Em *Pinus glauca*, a fase de iniciação sofreu forte influência genética, correspondendo a 69% da variação total na iniciação de massa pró-embriogênica, diminuindo gradativamente para a fase de proliferação (38%), maturação (9%) e conversão (3%) (PARK, 2002). Para *Pinus armandii* foi testada indução da embriogênese somática em nove famílias dentre as quais cinco apresentaram formação de massas pró-embriogênicas (MARUYAMA, HOSOI e

ISHII, 2007). Desempenhos diferentes também foram encontrados entre matrizes do híbrido *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* no qual foram analisadas cinco famílias das quais três se sobressaíram na indução da embriogênese somática (NUNES et al., 2017). Para *Picea abies* L. foi possível identificar linhagens altamente embriogênicas e que eram fenotipicamente semelhantes às com capacidade reduzida de iniciação (BECWAR, NOLAND e WYCKOFF, 1989).

A compreensão do efeito do genótipo na embriogênese somática é essencial para a melhoria do processo para que se possa desenvolver protocolos específicos para genótipos específicos (PARK, BARRET e BONGA, 1998). Diferenças na habilidade das famílias para alcançar a iniciação indicam que a seleção adequada de árvores matrizes ou, em alguns casos, o uso de cruzamentos controlados, selecionando um genitor macho favorável, poderia ser utilizado para aumentar o número de genótipos responsivos (NUNES et al., 2017).

TABELA 4: Efeito do genótipo na formação de massas pró-embriogênicas utilizando embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

Matriz	Formação de massas pró-embriogênicas (%)
5	16,00 a
3	14,00 ab
2	5,00 abc
7	4,00 abc
6	3,00 bc
1	3,00 bc
4	2,00 c
8	1,00 c

As variâncias foram homogêneas pelo teste de Levene. As médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 5.1.4 Efeito dos meios de cultura com e sem adição de ácido fólico

Massas pró-embriogênicas foram observadas nos dois meios de cultura, com e sem adição de ácido fólico, após 42 dias de cultivo (TABELA 5, FIGURA 3F). O início da formação da massa pró-embriogênica foi observado a partir da extrusão na micrópila do gametófito feminino (FIGURA 2).

Não foi observada diferença estatística entre os meios de cultura para a formação de massas pró-embriogênicas (TABELA 5), tendo sido a porcentagem

de formação de massa pró-embriogênica de 9% no meio LOB sem adição de ácido fólico, 5% no meio LOB com adição de ácido fólico, 6% no meio QL e 4% no meio QL com adição de ácido fólico. Já para *Pinus taeda*, diferenças significativas foram observadas no crescimento de embriões somáticos em meio com adição de ácido fólico, que juntamente com a biotina, estimulou a formação de embriões somáticos na fase inicial de desenvolvimento (PULLMAN et al., 2005).

FIGURA 2: Extrusão da micrópila do gametófito feminino em *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (evidenciado pela seta).



Fonte: A autora, 2017.

TABELA 5: Efeito dos diferentes meios de cultura na formação de massas pró-embriogênicas utilizando a média de todos os genótipos em todas as datas de coletas dos embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

Tratamentos	Formação de massas pró-embriogênicas (%)
LOB	9,00 <sup>ns</sup>
LOB + ác. fólico	5,00 <sup>ns</sup>
QL	6,00 <sup>ns</sup>
QL + ác. fólico	4,00 <sup>ns</sup>

As variâncias foram homogêneas pelo teste de Levene. <sup>ns</sup>As médias não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O meio LOB possui uma maior concentração de sulfato de manganês, sulfato de zinco, nitrato de cálcio e sulfato de magnésio em relação ao meio QL, além de ter em sua composição cloreto de cálcio, cloreto de potássio e sulfato de ferro, não encontrados no meio QL. Já o meio QL apresenta uma maior

concentração de nitrato de potássio em relação ao meio LOB (TABELA 1). Além dos reguladores vegetais comuns aos dois meios (2,4-D, BAP e ABA), o meio LOB teve o acréscimo de AIB e cinetina nos meios de indução e pré-maturação (TABELA 2). Apesar das diferenças nas composições dos meios, não foram observadas diferenças estatísticas para a formação de massa pró-embriogênica.

O meio LOB foi utilizado inicialmente para a embriogênese somática em *Pinus taeda* utilizando gametófitos femininos imaturos (TANG e NEWTON, 2005) sendo o presente trabalho o primeiro a utilizar este meio para a embriogênese somática em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. O meio QL foi utilizado para embriogênese somática do *Pinus radiata* (MONTALBAN, DIEGO e MONCALEÁN, 2010) e *Pinus nigra* (RADOJEVIC et al., 1999; SALAJOVA et al., 2005) e já foi testado para a embriogênese somática em *Pinus caribaea* var. *hondurensis* utilizando como explante embriões zigóticos maduros no qual foram obtidos 37% de formação de massas pró-embriogênicas (ZANELLA, 2016).

Ao analisar estatisticamente a média de formação de massa embriogênica para as duas matrizes com maior porcentagem de formação de massa pró-embriogênica, matriz cinco e três, nas melhores datas de coleta, 06/12/2016 e 26/12/2016, foi possível observar diferença estatística entre os meios de cultura (TABELA 6). Esse resultado assemelha-se com o encontrado por Zanella (2016), que utilizou gametófito feminino maduro na indução da embriogênese somática em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, e obteve 37% de formação de massas pró-embriogênicas no meio QL sem adição de ácido fólico.

TABELA 6: Efeito dos diferentes meios de cultura na formação de massas pró-embriogênicas utilizando a média das melhores matrizes nas melhores datas de coleta de embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

Tratamentos	Formação de massas pró-embriogênicas (%)
LOB	38,75 a
QL	30,00 ab
LOB + ác. fólico	21,25 b
QL + ác. fólico	18,75 b

As variâncias foram homogêneas pelo teste de Levene. As médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a análise foram consideradas as médias das duas matrizes mais responsivas nas duas melhores datas de coleta.

TABELA 7: Efeito dos diferentes meios de cultura na formação de massas pró-embriogênicas utilizando a média das melhores datas de coleta de embriões imaturos para cada matriz de *Pinus caribaea var. hondurensis*.

Tratamentos	Formação de massas pró-embriogênicas (%)							
	Matrizes							
	1	2	3	4	5	6	7	8
LOB	15,00 <sup>ns</sup>	15,00 <sup>ns</sup>	27,00 <sup>ns</sup>	5,00 <sup>ns</sup>	40,00 <sup>ns</sup>	10,00 <sup>ns</sup>	10,00 <sup>ns</sup>	10,00 <sup>ns</sup>
LOB + ác. fólico	5,00 <sup>ns</sup>	10,00 <sup>ns</sup>	12,00 <sup>ns</sup>	5,00 <sup>ns</sup>	25,00 <sup>ns</sup>	10,00 <sup>ns</sup>	10,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>
QL	10,00 <sup>ns</sup>	10,00 <sup>ns</sup>	17,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	35,00 <sup>ns</sup>	5,00 <sup>ns</sup>	15,00 <sup>ns</sup>	5,00 <sup>ns</sup>
QL + ác. fólico	10,00 <sup>ns</sup>	10,00 <sup>ns</sup>	10,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	20,00 <sup>ns</sup>	5,00 <sup>ns</sup>	5,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>

As variâncias foram homogêneas pelo teste de Levene. <sup>ns</sup>As médias não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Embora não tenham diferido estatisticamente na média geral de todas as matrizes em todas as datas de coleta (TABELA 5), e na análise de cada matriz nas duas melhores datas de coleta (TABELA 7) (ANEXO 2), o meio LOB sem adição de ácido fólico apresentou formação de quatro embriões somáticos, em duas massas pró-embriogênicas, após um período de 80 a 90 dias a partir do início da formação da massa pró-embriogênica. Nesse período, foi possível observar uma mudança na coloração do embrião, que inicialmente era de coloração clara e translúcida, para uma coloração escura e opaca. Com o auxílio de uma lupa, foi possível observar a formação de cotilédones (FIGURA 3G).

Não foi observada formação de embriões nos meios QL com e sem adição de ácido fólico e meio LOB com adição de ácido fólico.

### 5.1.5 Avaliação do potencial embriogênico e análise histológica

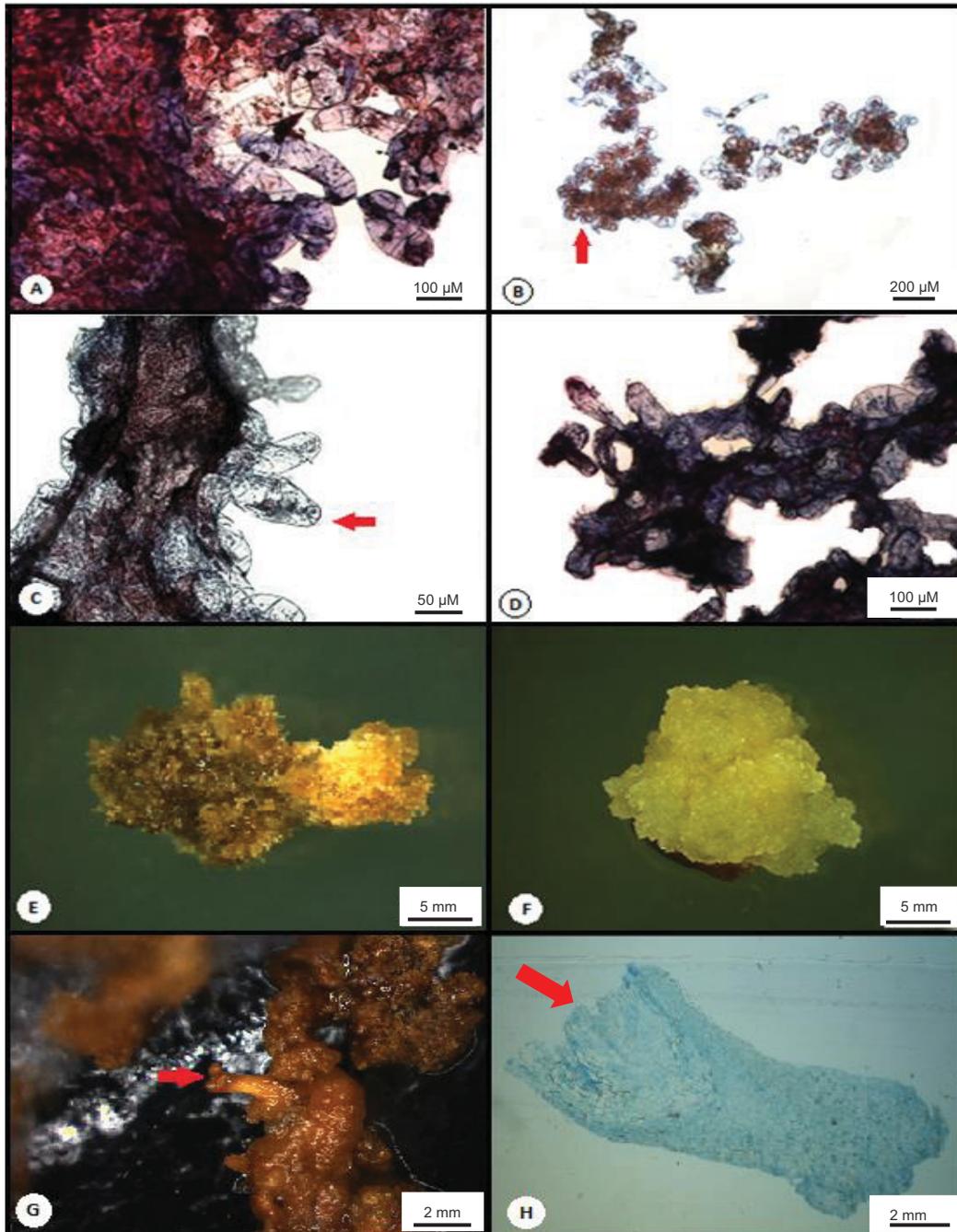
Avaliou-se o potencial embriogênico ao longo dos subcultivos e foi observado que a partir do 6º subcultivo (126 dias após o início do experimento) a massa pró-embriogênica perdeu consideravelmente o seu potencial, diminuindo a quantidade de células embriogênicas. As células embriogênicas são isodiamétricas e com citoplasma denso, e ao serem tratadas com o corante carmim acético, adquirem uma coloração vermelha (FIGURA 3 A e B). As células não embriogênicas, que se diferenciam das embriogênicas por serem irregulares e altamente vacuoladas, adquirem uma coloração azul ao serem tratadas com corante azul de Evans (FIGURA 3 C e D).

A avaliação com carmim acético e azul de Evans também evidenciou a presença de células somáticas (agrupadas e arredondadas) em todos os tratamentos, indicado pela seta na FIGURA 3B e a presença de células de suspensor, na qual os embriões somáticos são formadas, indicado pela seta na FIGURA 3C. Resultado semelhante foi encontrado para *Picea omorika* (MIHALJEVIĆ; JELASKA, 2005), *Picea glauca* (YEUNG; THORPE, 2005), *Pinus patula* (FORD et al., 2005), *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (ZANELLA, 2016) e para o híbrido *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (NUNES et al., 2017).

Logo no início da formação das massas pró-embriogênicas foi possível diferenciar as que eram embriogênicas das não embriogênicas. As não embriogênicas apresentaram coloração escura e opaca e eram de textura compacta e rígida (FIGURA 3E), diferentemente das pró-embriogênicas, que apresentaram coloração branca, translúcida e eram friáveis (FIGURA 3F). Massas pró-embriogênicas semelhantes também foram observadas em *Pinus caribaea* (MALABADI; SILVA e MULGUND, 2011), *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (ZANELLA, 2016) e *Pinus roxburghii* (ARYA; KALIA e ARYA, 2000).

As massas pró-embriogênicas tiveram sua iniciação a partir do 42º dia no meio de indução; células somáticas e de suspensor foram observadas a partir do 63º dia. Após 45 dias dos embriões em meio de pré-maturação, foi possível observar a formação dos cotilédones (FIGURA 3G). No meio de maturação, o embrião somático foi submetido ao estresse osmótico devido à presença de PEG no meio de cultura, o qual foi essencial para o desenvolvimento do embrião, onde se observa que não há ligação vascular entre o embrião somático e a massa pró-embriogênica (FIGURA 3H).

FIGURA 3: Coloração de células pró-embriogênicas com carmim acético e azul de Evans em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*: (A) 1º subcultivo; (B) 3º subcultivo; (C) 5º subcultivo; (D) 6º subcultivo. Diferença entre massa pró-embriogênica e não embriogênica em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*: (E) massa não embriogênica; (F) massa pró-embriogênica. (G) formação de cotilédones em *Pinus caribaea* var. *hondurensis* na fase de maturação. (H) secção histológica de embrião somático anormal de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* tratado com azul de toluidina 5%.



Fonte: A autora, 2017.

Apesar do embrião somático ter apresentado desenvolvimento dos cotilédones, a protoderme não estava bem desenvolvida, não possuía sistema

vascular formado e não houve desenvolvimento do meristema apical, indicado pela seta na FIGURA 3 H, sugerindo que os embriões obtidos eram anormais. A estrutura do meristema apical em um embrião somático maduro é ligeiramente convexa e as células dentro da primeira camada do meristema possuem citoplasma denso com núcleos proeminentes (STASOLLA; YEUNG, 2003). Embriões somáticos anormais também foram obtidos para *Pinus caribaea* var. *hondurensis* utilizando-se embriões zigóticos maduros como explantes (ZANELLA, 2016).

## 6 CONCLUSÕES

Com o presente trabalho, foi possível estabelecer a primeira etapa do processo de embriogênese somática em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Os embriões zigóticos imaturos foram os melhores explantes na obtenção de massas pró-embriogênicas, na presença de meio LOB sem adição de ácido fólico.

A melhor época de coleta dos embriões zigóticos imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, para a formação de massas pró-embriogênicas está entre os dias 06/12 e 26/12.

A espécie é genótipo dependente, com variação na indução da embriogênese somática para as oito matrizes testadas. Sendo assim, detalhes do protocolo necessitam ser adaptados de acordo com o genótipo utilizado.

Foi possível avaliar a capacidade embriogênica das amostras por meio dos testes histoquímicos e histológicos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para os próximos estudos, é necessário aumentar o número de repetições do experimento e coletar embriões zigóticos imaturos de uma quantidade maior de matrizes, visando selecionar indivíduos que sejam genótipo responsivos para a embriogênese somática.

Diferentes concentrações de ABA e PEG também devem ser testados na fase de maturação de embriões para se chegar a uma concentração ideal desses compostos para a obtenção de embriões somáticos bem formados.

Embora o processo de iniciação tenha ocorrido para *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, são necessárias modificações no protocolo visando aumentar a porcentagem de formação de massas pró-embriogênicas, melhorar o desenvolvimento e amadurecimento de embriões somáticos e aumentar a conversão de embriões somáticos em plantas para que possam ser levados à campo. Com essas melhorias será possível a utilização do protocolo de embriogênese somática para a produção em larga escala e a conservação *in vitro* de embriões somáticos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, N. F. **Avaliação da qualidade da madeira de um híbrido de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* para produção de lâminas e manufatura de compensados**. Dissertação (mestrado em ciências, programa: recursos florestais. Opção em: tecnologia de produtos florestais). Universidade de São Paulo, escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, p. 116, 2011.

AQUEA, F.; ARCE-JOHNSON, P. Identification of genes expressed during early somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 559-568, 2008.

AGUIAR, V. A.; SOUSA, V. A.; SHIMIZU, J. Y. Espécies de pinus mais plantadas no Brasil. **Revista Madeira**, v. 24, p. 43-56, 2013.

AGUIAR, V. A.; SOUSA, V. A.; SHIMIZU, J. Y. **Espécies de pinus mais plantadas no Brasil**. EMBRAPA Florestas, v.5, 2ª ed. 2014.

ARONEN, T.; PEHKONEN, T.; RYYNANEN, L. Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris*. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 24, p. 372-383, 2009.

ARYA, S.; KALIA, R. K.; ARYA, L. D. Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburgii* Sarg. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 775-780, 2000.

ATREE, S. M.; POMEROY, M. K.; FOWKE, L. C. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. **Planta**, v. 187, p. 395-404, 1993.

BECWAR, M. R.; NOLAND, T. L.; WYCKOFF, J. L.; Maturation, germination, and conversion of norway spruce (*Picea abies* L.) Somatic embryos to plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 25, p. 575-580, 1989.

BRACELPA. **Publicação Mensal da Associação Brasileira de Celulose e Papel**. São Paulo, 2013.

CARNEROS, E.; CELESTINO, C.; KLIMASZEWSKA, K.; PARK, Y. S.; TORIBIO, M.; BONGA, J. M. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, p. 165-178, 2009.

CARPANEZZI, A. A.; FERREIRA, C. A.; ROTTA, E.; NAMIKAWA, I. S.; STURION, J. A.; PEREIRA, J. C. D.; MONTAGNER, L. H.; RAUEN, M. J.; CARVALHO, P. H. R.; SILVEIRA, R. A.; ALVES, S. T.; **Zoneamento ecológico para plantios florestais no estado do Paraná**. Brasília: Embrapa, CNPF. p. 86, Documentos 17, 1986.

CHAVEZ L. A.; FLINN, B. S; EGERTSDOTTER U. Initiation of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oocarpa pine (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schlechtendal). **Tree Physiology**, v. 31, p. 539-54, 2011.

CYR, D.; KLIMASZEWSKA, K. **Conifer somatic embryogenesis: II**. Applications. *Dendrobiology*, v. 48, p. 41-49, 2002.

DIAS, P. C. **Avaliação genética de clones de *Pinus taeda* propagados via Embriogênese somática**. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para Obtenção do título de *Doctor Scientiae*. Viçosa Minas Gerais, 2013.

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

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2007. ***Pinus caribaea***. Disponível em:  
<http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=1691>. Acesso em:  
10/12/2017.

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

FORD, C. S.; FISCHER, L. J.; JONES, N. B.; NIGRO, S. A.; MAKUNGA, N. P.; STADEN, J. V. Somatic embryogenesis in *pinus patula*. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. **Forestry Sciences**, v. 77, p. 121-140, 2005.

GARIN, E.; ISABEL, N.; PLOURDE, A. Screening of large numbers of seed of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 37-43, 1998.

GARIN, E.; BERNIER-CARDOU, M.; ISABEL, N.; KLIMASZEWSKA, K.; PLOURDE, A. Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Laurentian Forestry Centre. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, p. 27-37, 2000.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Apostila de biotecnologia-CCA/UFSC- **Introdução ao conceito de biotecnologia**. Florianópolis-SC, p. 41, 2006.

GUPTA, V. K.; PRASAD, K. S.; BAKSHI, M. P. S.; LANGAR, P. N. Improving the nutritive value of groundnut shells through fungal cultivation. **Agricultural Wastes**, v. 16, p. 161-169, 1986.

HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zigotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, p. 74-81, 1978.

HUSSEIN, S.; IBRAHIM, R.; KIONG, A. L. P. Somatic embryogenesis: an alternative method for in vitro micropropagation. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 156-161, 2006.

IBÁ, Indústria brasileira de árvores, **Relatório Ibá**. 2015. Brasília. Disponível em: < [http://iba.org/images/shared/iba\\_2015.pdf](http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf)>. Acesso: 30/08/2017.

IBÁ, Indústria brasileira de árvores, **Relatório Ibá**. 2016. Brasília. Disponível em: < [http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf)>. Acesso: 30/08/2017.

JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. Somatic Embryogenesis in Woody Plants. **Forest Sciences**: v. 3: Gymnosperms, 1995.

JOHANSEN, D. A. Plant Microtechnique. New York, **McGraw-Hill Book Company Inc.**, 523 p., 1940.

KARAMI, O.; AGHAVAISI, B.; POUR, A. M. Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. **Journal of Chemical Biology**, v. 2, p. 177-190, 2009.

KLIMASZEWSKA, K.; PARK, Y. S.; OVERTON, C.; MACEACHERON, I.; BONGA, J. M. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 37, p. 392-399, 2001.

KLIMASZEWSKA, K.; CYR, D. R. **Conifer somatic embryogenesis: I**. Development. *Dendrobiology*, v. 48, p. 31-39, 2002.

KLIMASZEWSKA, K.; RUTLEDGE, R. G.; SÉGUIN, A. **Genetic Transformation of Conifers Utilizing Somatic Embryogenesis**. *Methods in molecular biology. Transgenic Plants - Methods and Protocols*. Edited by Leandro Peña Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Valencia, p. 151-163, 2005.

KLIMASZEWSKA, K.; TRONTIN, J. F.; BECWAR, M. R.; DEVILLARD, C.; PARK, Y. S.; WALTER, M. A. L. Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. tree and forestry Science and biotechnology. **Global Science Books**. p. 11-25, 2007.

LAINE, E.; DAVID, A. Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus caribaea*. **Plant Science**, v. 69, p. 215-224, 1990.

LEAL, I.; MISRA, S.; ATTREE, S. M.; FOWKE, L. C. Effect of abscisic acid, osmoticum and desiccation on 11S storage protein gene expression in somatic embryos of white spruce. **Plant Science**, v.106, p. 121–128, 1995.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de; TORRES, M. A. V. **Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 368, 2003.

MALABADI, R. B.; CHOUDHURY, H.; TANDON, P. Initiation, maintenance and maturation of somatic embryos from thin dome sections in *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord) promoted by partial desiccation and gellan gum. **Scientia Horticulturae**, v. 102, p. 449-459, 2004.

MALABADI R. B.; SILVA, J. A. T.; MULGUND, G. S. Induction os Somatic Embryogenesis in *Pinus caribaea*. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v.5 p.27-32. 2011.

MARUYAMA, E.; HOSOI, Y.; ISHII, K. Propagation of japanese red pine (*Pinus densiflora* zieb. Et zucc.) via somatic embryogenesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 5, p. 199-204, 2005.

MARUYAMA, E.; HOSOI, Y.; ISHII, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 43, p. 28-34, 2007.

MIHALJEVIĆ, S.; JELASKA, S. Omorika spruce (*Picea omorika*). Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. **Forestry Sciences**, v. 77, p. 35-45, 2005.

MONTALBÁN, A.; DIEGO, N.; MONCALEÁN, P. Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. **Trees**, v. 24, p. 1061-1071, 2010.

NEUTELINGS G.; DOMON, J. M.; MEMBRÉ, N.; BERNIER, F.; MEYER, Y.; DAVID, A.; DAVID, H. Characterization of a germin-like protein gene expressed in somatic and zygotic embryos of pine (*Pinus caribaea* Morelet). **Plant Molecular Biology**, v. 38, p. 1179-1190, 1998.

NEWTON, R. J.; TANG, W.; JAIN, M. Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.). Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. **Forestry Sciences**, v. 77, p. 1-10, 2005.

NUNES, S.; MARUM L.; FARINHA, N.; PEREIRA, V. T.; ALMEIDA, T.; SOUSA, D.; MANO, N.; FIGUEIREDO, J.; DIAS, M.C.; SANTOS, C. Somatic embryogenesis of hybrid *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis* and ploidy assessment of somatic plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.132, p. 71-84, 2017.

PARK, Y. S.; BARRET, J. D.; BONGA, J. M. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 34, p. 231-239, 1998.

PARK, Y. S. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. **Annals of Forest Science**, v. 59, p. 651-656, 2002.

PARK, Y. S.; LELU-WALTER, M. A.; HARVENGT, L.; TRONTIN, J. F.; MACEACHERON, I.; KLIMASZEWSKA, K.; BONGA, J. M. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 87-101, 2006.

PULLMAN, G. S.; JOHNSON, S. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates, *Ann. Forest Science*, v. 59, p. 663-668, 2002.

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

PULLMAN, G. S.; NAMJOSHI, K.; ZHANG, Y. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*): improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate. *Plant Cell Reports*, v. 22, p. 85-95, 2003.

PULLMAN, G. S.; ZHANG, Y.; PHAN, B. H. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Reports*, v. 22, p. 96-104, 2003.

PULLMAN, G. S.; JOHNSON, S.; VAN TASSEL, S.; ZHANG, Y. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MES pH buffer, biotin, and folic acid. *Plant Cell Reports*, v. 80, p. 91-103, 2005.

PULLMAN, G. S.; BUCHANAN, M. Identification and quantitative analysis of stage-specific organic acids in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) zygotic embryo and female gametophyte. *Plant Science*, v. 170, p. 634-647, 2006.

QUOIRIN, M.; LEPROIVE, P. Improved media for in vitro culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae. The Hague*, v. 78, p. 437-442, 1977.

RADOJEVIC, L.; ÁLVAREZ, C.; FRAGA, M. F.; RODRÍGUEZ, R. Somatic embryogenic tissue establishment from mature *Pinus nigra* Arn. Ssp. *Salzmannii* embryos. *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, v. 35, p. 206-209, 1999.

SALAJOVA, T.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M. J.; DIEGO, L. B.; BERDASCO, M.; RADOJEVIC, L.; SALAJ, J. Protocol of somatic embryogenesis of *Pinus nigra* Arn. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. **Forestry Sciences**, v. 77, p. 81-94, 2005.

SANTOS, W. Variação genética e desempenho de progênies de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* para produção de madeira e resina. **Dissertação**. Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de São Paulo, Ilha Solteira-SP. 2014.

SANTOS, W.; ARAÚJO, E. G.; SOUZA, D. C. L.; SILVA, J. R.; RECCO, C. R. S. B.; MORAES, M. L. T.; AGUIAR, A. V. Divergência genética entre progênies de polinização aberta de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* a partir de caracteres quantitativos. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, p. 127-133, 2016.

STASOLLA, C.; KONG, L.; YEUNG, E. C.; THORPE, T. A. Maturation of somatic embryos in conifers: Morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 38, p. 93-105, 2002.

STASOLLA, C.; VAN ZYL, L.; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D.; LIU, W.; SEDEROFF, R. R. The effect of polyethylene glycol on gene expression. Of developing White Spruce Somatic Embryos. **Plant Physiology**, v.131, p. 49-60, 2003.

STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 15-35, 2003.

SUASSUNA, J. A cultura do Pinus: uma perspectiva e uma preocupação. **Brasil Florestal**, v. 8, 1977.

TANG, W.; NEWTON, R. J. Loblolly pine (*Pinus taeda*). Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. **Forestry Sciences**, v. 77, p. 95-106, 2005.

THOMPSON, D.; HARRINGTON, F. *Sitka spruce (Picea sitchensis)*. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. **Forestry Sciences**, v. 77, p. 69-80, 2005.

TRIANOSKI, R. Avaliação da qualidade da madeira de espécies de Pinus tropicais por meio de métodos convencionais e não destrutivos. **Tese**. Doutorado em Engenharia Florestal: Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR. 2012.

VAGNER, M.; FISCHEROVÁ, L.; SPACKOVÁ, J.; VONDRÁKOVÁ, Z. Somatic embryogenesis in norway spruce. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. **Forestry Sciences**, v. 77, p. 141-155, 2005.

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

VON ARNOLD, S.; LARSSON, E.; ABRAHAMSSON, M.; UDDENBERG, D.; VESTMAN, D.; CLAPHAM, D. Regulation of early stages during somatic embryogenesis in Norway Spruce and Scots pine. **In: Proceedings of the IUFRO Working Party**, Montpellier, France, p. 105-106, 2011.

WALTER, C.; FIND, J. I.; GRACE, L. J. Somatic embryogenesis and genetic transformation in *Pinus radiata*. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. **Forestry Sciences**, v. 77, p. 11-24, 2005.

WREGE, M. S.; FRITZSONS, E.; SHIMIZU, J. Y.; AGUIAR, A. V. de; CARAMORI, P. H. Pinus tropical com potencial para uso em plantios comerciais no Brasil. **Revista do Instituto Florestal**, v. 26, p. 137-145, 2014.

YEUNG, E. C.; THORPE, T. A. Somatic embryogenesis in *Picea glauca*. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. **Forestry Sciences**, v. 77, p. 47-58, 2005.

ZANELLA, L. B. Embriogênese somática em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.  
**Dissertação.** Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná,  
Curitiba-PR. 2016

## ANEXOS

ANEXO 1 - Resultado da análise de variância para a interação entre os fatores analisados na formação de massas pró-embriogênicas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

Fonte de Variação	Formação de massa pró-embriogênica		
	GL	Quadrado Médio	Sig.
Coleta	4	0,543	0,000 *
Meio	3	0,072	0,294 <sup>ns</sup>
Matriz	7	0,269	0,000 *
Coleta x Meio x Matriz	84	0,006	1,000 <sup>ns</sup>
Coleta x Meio	12	0,004	1,000 <sup>ns</sup>
Coleta x Matriz	28	0,028	0,986 <sup>ns</sup>
Meio x Matriz	21	0,004	1,000 <sup>ns</sup>
Resíduo	160		
TOTAL	319		

\* significativo a 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo a 5% de probabilidade

ANEXO 2 – Resultado da análise de variância dos diferentes meios de cultura na formação de massas pró-embriogênicas utilizando a média das melhores datas de coleta de embriões imaturos para cada matriz de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

Matriz	Formação de massa pró-embriogênica							
	Quadrado Médio							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Fonte de Variação								
LOB	0,150	0,150	0,300	0,060	0,200	0,100	0,100	0,100
LOB + ác. fólico	0,060	0,100	0,200	0,060	0,125	0,100	0,100	0,000
QL	0,100	0,100	0,250	0,000	0,125	0,060	0,060	0,050
QL + ác. fólico	0,100	0,100	0,200	0,000	0,075	0,060	0,060	0,000
Sig.	0,734 <sup>ns</sup>	0,948 <sup>ns</sup>	0,866 <sup>ns</sup>	0,575 <sup>ns</sup>	0,430 <sup>ns</sup>	0,420 <sup>ns</sup>	0,875 <sup>ns</sup>	0,292 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> não significativo a 5% de probabilidade