

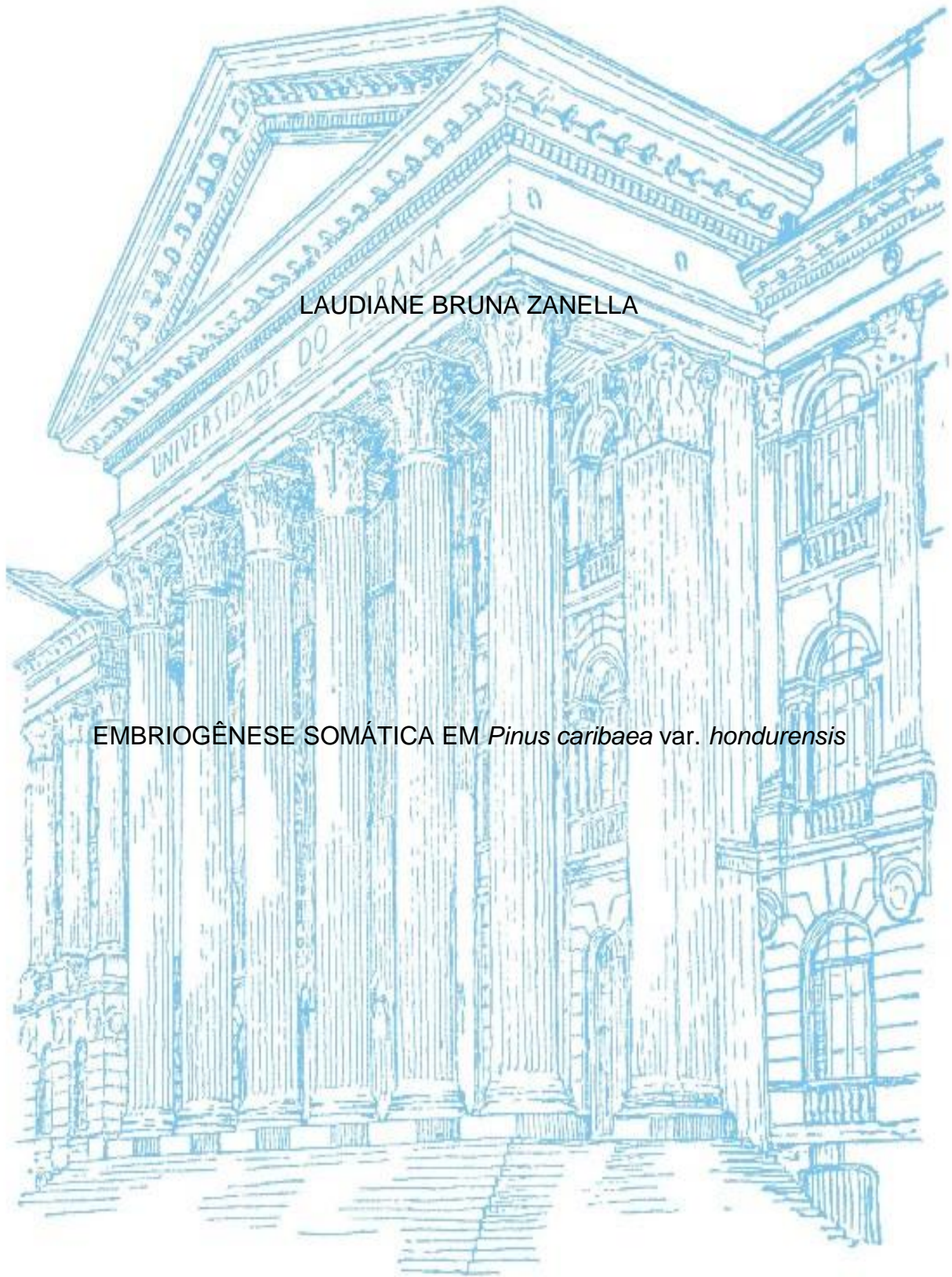
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAUDIANE BRUNA ZANELLA

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus caribaea* var. *hondurensis*

CURITIBA

2016



LAUDIANE BRUNA ZANELLA

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus caribaea* var. *hondurensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marguerite G. G. Quoirin

Co-orientadora: Dr.^a Juliana Degenhardt-Goldbach

CURITIBA

2016

Z28 Zanella, Laudiane Bruna
Embriogênese somática em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.
Laudiane Bruna Zanella. - Curitiba: 2016.
54 f. il.

Orientadora: Marguerite G. G. Quoirin
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação
em Agronomia.

1. Plantas – Progação in vitro. 2. Embriogênese somática.
3. Pinheiro-do-caribe. I. Quoirin, Marguerite G. G. II. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 631.532:582.475-4



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata LAUDIANE BRUNA ZANELLA, sob o título "EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus caribaea* var. *hondurensis*", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "APROVAÇÃO" da Dissertação.

Curitiba, 15 de Agosto de 2016.

Professor Dr. Cicero Deschamps
Coordenador do Programa

Professora Dra. Neusa Steiner
Primeira Examinadora

Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Segundo Examinador

Professora Dra. Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin
Presidente da Banca e Orientadora

Á Deus, pela vida.

Á minha família, minha mãe Dolores, meu pai Laudemir, minha irmã Lauriane e ao meu noivo Neto. Vocês são a razão e a força para as minhas conquistas.

Aos meus avós, Ortenila (*in memoriam*), José, Iracema e Luiz (*in memoriam*), por todo amor, carinho e incentivo nessa caminhada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Á Deus e a Nossa Senhora por me darem força suficiente para a conclusão deste trabalho e por tornarem possível minha caminhada até aqui.

Aos meus pais, que de forma brilhante e com grande visão de futuro iniciaram tudo isso, sempre me incentivando a estudar e conquistar o meu espaço no mundo. Obrigada, por sempre terem acreditado em mim.

Á minha irmã Lauriane, desde sempre minha grande amiga e companheira, obrigada pela dedicação, você é fundamental na minha vida. Ao meu noivo Neto, pela força, incentivo e, por sempre estar disposto a me ajudar, nunca mediu esforços para tornar minha vida melhor.

Á Prof.^a Dr.^a Marguerite Quoirin, pela orientação, paciência, ajuda e principalmente, pelo exemplo de pessoa e de profissional competantíssima que é.

Á Dr.^a Juliana Degenhardt-Goldbach, pela co-orientação, companheirismo, apoio, e principalmente, por acreditar em mim e sempre vibrar com minhas conquistas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade da realização deste trabalho.

Á Embrapa Florestas, pela estrutura cedida para o desenvolvimento da pesquisa.

Á Prof.^a Neusa Steiner pela ajuda com a histologia e pelas fotos tiradas do material, além da disponibilidade de auxiliar em algumas dúvidas decorrentes no mestrado.

As minhas queridas amigas e companheiras de todo dia, Cassiana, Thais, Janaína, Gisela, Fabrícia, Jessica, Gheniffer, Renata e Marianne, obrigada pela amizade sincera, em especial quero agradecer minhas parceiras Cassiana e Thais que hoje considero como parte da minha família, obrigada pelas ideias, risadas e de todo o carinho que tiveram comigo durante todo esse período, vocês foram a calma nos momentos de angustias.

Á Jessica Tomasi, pela disponibilidade em me auxiliar nos cortes histológicos.

Á Daiane, Marianne e Cassiana pela ajuda na Biologia Molecular.

Á Sheila Susy Silveira por me ajudar nas análises estatísticas e pelas palavras de incentivo e apoio, ao Rodrigo Cordeiro quero agradecer pelas risadas e momentos de descontração.

Á família Pedrozo, pelo carinho e torcida.

Aos meus amigos, mesmo estando ausente, se fizeram presentes durante todos esses anos do mestrado. Muito Obrigada!!!

O futuro pertence aqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.

Eleanor Roosevelt

Embriogênese Somática em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*

RESUMO

A embriogênese somática (ES) consiste na formação de embriões a partir de células somáticas, num processo morfogenético semelhante àquele verificado para a embriogênese zigótica. Dentre as suas potencialidades encontram-se a propagação massal e clonal de genótipos elite, a criopreservação dos tecidos embriogênicos, além da conservação *ex situ* de germoplasma de espécies ameaçadas de extinção. Esse trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de embriogênese somática de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Para tanto, na fase de indução da embriogênese somática foram comparados os meios DCR, QL e WV5 com e sem adição de ácido fólico (100 mgL^{-1}); a seguir foram utilizados vários tipos de explantes iniciais: megagametófito maduro, acículas, hipocótilos e raízes de plântulas recém germinadas, e, finalmente, testadas três concentrações de 2,4-D (0, 10, 20 e $30 \text{ } \mu\text{M}$) combinadas com BAP (0, 2, 4 e $8 \text{ } \mu\text{M}$). O meio básico de indução da embriogênese continha os sais do meio QL, sacarose, mio-inositol, glutamina, caseína hidrolisada, tiamina, 2,4-D, BAP, ágar e (100 mgL^{-1}) de ácido fólico. Na fase de maturação dos embriões somáticos, foi avaliado o efeito do PEG-3500 (10%) no meio básico sem 2,4D nem BAP e com a adição de ABA e carvão ativado. As culturas foram mantidas no escuro a $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 90 dias foram avaliadas a porcentagem de explantes com calos, a formação de embriões somáticos anormais e a oxidação. Além disso, foi realizada a coloração dos calos com carmim acético e azul de Evans para confirmar se eram embriogênicos. O formato e a coloração dos embriões no meio de maturação foram avaliados após 60 e 90 dias. Na fase de indução, o melhor meio foi o QL com adição de ácido fólico, com 48% de explantes formando calos. O megagametófito foi o único explante que apresentou o desenvolvimento de embriões somáticos anormais. Utilizando o megagametófito maduro como explante, observou-se que a melhor combinação de 2,4-D e de BAP foi $10 \text{ } \mu\text{M}$ de 2,4-D e $2 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP. O teste de coloração indicou a presença de células embriogênicas em todos os tratamentos de todos os experimentos. Na fase de maturação, o uso de 10% de PEG-3500 não foi favorável para o desenvolvimento dos embriões somáticos. Na fase de indução da embriogênese somática, o melhor resultado foi obtido cultivando megagametófitos em meio QL suplementado com 100 mgL^{-1} de ácido fólico, 2,4-D ($10 \text{ } \mu\text{M}$) e BAP ($2 \text{ } \mu\text{M}$). No presente estudo não foi possível a obtenção de embriões somáticos normais.

Palavras-chave: ácido fólico; megagametófitos; 2,4D; BAP; PEG3500.

Somatic embryogenesis in *Pinus caribaea* var. *hondurensis*

ABSTRACT

Somatic embryogenesis (SE) is the formation of embryos from somatic cells, a morphogenetic procedure similar to that observed for the zygotic embryogenesis. Among its strengths are the mass and clonal propagation of elite genotypes, cryopreservation of embryogenic tissues, as well as *ex situ* conservation of germplasm of endangered species. This study aimed to develop a somatic embryogenesis protocol *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Therefore, the induction phase of somatic embryogenesis compared the DCR, QL and WV5 culture media with and without addition of folic acid. Various kinds of initial explants were used: mature megagametophyte, needles, hypocotyls and roots of newly germinated seedlings, and finally three concentrations of 2,4-D (0, 10, 20 and 30 μM) in combination with BAP (0, 2, 4 and 8 μM) were tested. The basic medium for embryogenesis induction contained the QL salts, sucrose, myo-inositol, glutamine, casein hydrolizate, thiamine, 2,4-D, BAP, agar and 100 mg L^{-1} of folic acid. During the maturation stage, we evaluated the effect of PEG-3500 (10%) in basal medium without 2,4-D and BAP or with the addition of ABA and activated charcoal. Cultures were maintained in the dark at 23 ± 2 ° C. After 90 days the percentage of explants with callus, somatic embryos formation and oxidation were evaluated. In addition, staining of callus was performed with acetic carmine and Evans Blue to confirm whether they were embryogenic. The format and staining of embryos in maturation medium were evaluated after 60 and 90 days. In the induction phase, the QL medium with the addition of folic acid was better, with 48% explants forming calli. The megagametophyte was the only explant forming abnormal somatic embryos. Using the mature megagametophyte, the best concentrations of 2,4-D combined with BAP were 10 and 2 μM respectively. The staining test indicated the presence of embryogenic cells in all treatments. During the maturation phase, the use of 10% PEG-3500 was not favorable for the development of somatic embryos. The best treatment for callus induction from megagametófitos was QL medium supplemented with 100 mg L^{-1} folic acid, 2,4-D (10 μM) and BAP (2 μM). In the present study normal somatic embryos were not observed.

Keywords: Plant tissue culture, somatic embryos, embryogenic callus, folic acid.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO <i>PINUS</i> NO BRASIL	8
2.2 <i>Pinus caribaea</i>	9
2.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CONÍFERAS	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 LOCAL DE ESTUDOS E MATERIAL VEGETAL	15
4.2 DESINFESTAÇÃO E INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	15
4.3 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	15
4.3.1 Meios de Cultura combinados ou não com ácido fólico para indução da embriogênese somática	15
4.3.2 Tipo de explantes	17
4.3.3 Combinações de 2,4-D e BAP	18
4.4 MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS	19
4.4.1 Efeito do polietilenoglicol (PEG).....	19
4.5 CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTURA.....	19
4.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E CITOQUÍMICAS	19
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	20
4.8 CURVA DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS EMBRIOGÊNICAS (MASSA SECA)	20
4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	22
5.1.1 Efeito do meio de cultura e do ácido fólico.....	22
5.1.2 Efeito do tipo de explante	25
5.1.3 Efeito de combinações de 2,4-D e BAP	26
5.2 MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS	29
5.2.1 Efeito do PEG	29
5.3 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL, CORTES HISTOLÓGICOS E ESTUDO HISTOQUÍMICO DE AMIDO E PROTEÍNA	30
5.4 CURVA DE CRESCIMENTO (MASSA SECA) E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE EMBRIOGÊNICA.....	33

6. CONCLUSÃO.....	36
7. REFERÊNCIAS	37
8. ANEXOS	46

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Composição Iônica dos sais e concentrações das vitaminas dos meios de cultura utilizados para indução de embriogênese somática em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. 16
- TABELA 2 - Composição do meio de cultura utilizadas nas etapas da embriogênese somática para o *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. 18
- TABELA 3 - Efeito de diferentes meios de cultura na calogênese e embriogênese somática de megagametófitos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* após 90 dias de cultura..... 23
- TABELA 4 - Efeito da adição de ácido fólico (100 mg L^{-1}) na calogênese e embriogênese somática de megagametófitos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* após 90 dias de cultura. 23
- TABELA 5 – Calogênese em diferentes explantes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* cultivados por 90 dias em meio QL adicionado de ácido fólico (100 mg L^{-1}). 26
- TABELA 6 - Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e de BAP na indução de calos em meio QL adicionado de ácido fólico (100 mg L^{-1}) na calogênese de megagametófito de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* após 90 dias de cultura..... 27

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Etapas da embriogênese somática em gimnospermas. 12

FIGURA 2 - Percentagem de indução dos calos em megagametófitos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* em função de diferentes concentrações de BAP combinados com diferentes concentrações de 2,4-D após 90 dias de cultura..... 28

FIGURA 3 – Aspectos de morfogênese da embriogênese somática de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, cortes histológicos de estruturas embriogênicas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* e análises histoquímicas de amido e proteína.. 31

FIGURA 4 – Curva de crescimento de culturas embriogênicas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* cultivadas em meio ES1 (massa seca). 34

LISTA DE ABREVIATURAS

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

ABA – Ácido Abscísico

BAP – Benzilaminopurina

DCR – Meio de cultura de GUPTA e DURZAN (1985)

ES – Embriogênese somática

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

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

PEG – Polietilenoglicol

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

WV5 – Meio de cultura de COKE (1996)

1. INTRODUÇÃO

A silvicultura com espécies exóticas no Brasil, baseada principalmente em espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, desempenha um importante papel socioeconômico, fornecendo matéria-prima para a produção de madeira, lenha, carvão, celulose, entre outros. A madeira do *Pinus* é utilizada para produção de celulose de fibra longa, destinada à produção de papéis, chapas, painéis de madeira e indústria moveleira. Além disso, do *Pinus* é extraída a resina, produto importante para a exportação, assim como o breu e a terebintina.

Dentre os *Pinus* tropicais mais plantados mundialmente, encontra-se *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barr. & Golf. caracterizado pela sua adaptabilidade a diferentes tipos de solos e com a característica de atingir cerca de 30 metros, é altamente propensa a produzir um padrão de crescimento apical acentuado, com poucas ou até sem ramificações. Sua madeira é qualificada para a produção de papel e celulose e principalmente para a extração de resina, além de ser utilizada em serrarias. É considerado um dos *Pinus* mais utilizados em área de reflorestamentos, principalmente em zonas tropicais devido a sua grande adaptabilidade ambiental, possui uma rápida disseminação, inclusive em áreas onde é considerada exótica, o que faz com que as variedades do *P. caribaea* não se encontrem em extinção (KRONKA, 2005).

As espécies do gênero *Pinus* possuem, em geral, dificuldade para responder aos métodos convencionais de propagação vegetativa, o que é considerado um fator limitante para o melhoramento vegetal. Com isso, métodos de cultura de tecidos vêm sendo empregados com sucesso como ferramenta auxiliar ao melhoramento, e, entre eles, destaca-se a embriogênese somática.

Esta técnica, considerada uma das mais importantes da biotecnologia vegetal, possibilita a propagação massal clonal de genótipos elite, em um processo onde células isoladas, ou um pequeno grupo de células somáticas, dão origem a embriões, num processo morfogenético que se aproxima da sequência de eventos observados na embriogênese zigótica.

Comparada com outros métodos de propagação *in vitro*, a embriogênese somática oferece algumas vantagens no melhoramento florestal incluindo a criopreservação dos tecidos embriogênicos e a conservação *ex situ* de germoplasma de espécies ameaçadas de extinção. Além disso, a técnica pode ser utilizada no melhoramento de forma reversa, na qual, após os cruzamentos, os embriões são primeiramente clonados por embriogênese somática e então criopreservados, para então serem testados a campo. Assim, após a seleção é possível acessar novamente o material criopreservado e recuperar os clones de interesse.

Para as espécies de *Pinus*, protocolos de embriogênese somática vem sendo extensivamente estudados. Protocolos eficientes já foram obtidos para algumas espécies, sendo inclusive utilizados comercialmente para *Pinus taeda*. No entanto, a utilização comercial para a maioria das espécies ainda não é uma realidade e a maioria das espécies tem se mostrado mais recalcitrantes à esta técnica. Para *P. caribaea*, foram relatados na literatura apenas três trabalhos, dois deles para a variedade *caribaea* e um para a variedade *hondurensis*, a partir de embriões imaturos e de protoplastos.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo de embriogênese somática de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* testando diferentes meios de cultura, explantes e concentrações de 2,4-D combinado com BAP na fase de indução, além do efeito do PEG na fase de maturação dos embriões somáticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO *PINUS* NO BRASIL

A palavra *Pinus* tem origem do latim "Pinu", que significa pinheiro em português e o gênero engloba mais de 100 espécies diferentes. São originárias de regiões da Europa, Ásia, América do Norte e da América Central (IBÁ, 2015). No Brasil o *Pinus* chegou há mais de um século pelas mãos dos imigrantes europeus que plantavam espécies deste gênero para fins ornamentais (BRACELPA, 2010). Em 1936, o Instituto Florestal de São Paulo introduziu sementes de *Pinus taeda* e *P. elliottii*, para produção de matéria-prima para as indústrias de celulose e papel, madeira serrada e extração de resina, respectivamente (SBS, 2007).

Foi em 1950 que o plantio de *Pinus* teve início em escala comercial, para produção de madeira de uso industrial (ABRAF,2011). Logo, se deu início à introdução de diversas outras espécies, tendo como base, além de *Pinus taeda* e *P. elliottii*, os chamados *Pinus* tropicais (*P. caribaea* var. *caribaea*, *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *P. caribaea* var. *bahamensis*, *P. kesiya*, *P. patula*, *P. oocarpa*, *P. tecunumanii*, *P. strobus* e *P. maximinoi*). Assim, a produção de madeira de *Pinus* tornou-se viável em diversas regiões do Brasil, destacando-se, além das Regiões Sul e Sudeste, os estados de Minas Gerais e Bahia (BRACELPA, 2010).

A madeira de *Pinus* é utilizada para produção de celulose de fibra longa, destinada à produção de papéis, chapas, painéis de madeira e indústria moveleira. Além disso, dessa árvore são extraídos a goma resina, produto importante para a exportação, assim como o breu e a terebintina (FOELKEL e FOELKEL, 2008). Além de ser essencial para o suprimento de madeira para diversos usos, a sua cultura permite evitar o desmatamento de florestas nativas (KRONKA, 2005).

Segundo dados do IBGE (2013) o Brasil possui uma área de 5,98 milhões de hectares de florestas plantadas, sendo 3,75 milhões com eucalipto; 1,80 milhão com *Pinus* e 425,2 mil com outras espécies. Hoje, uma grande parcela de florestas plantadas de *Pinus* é de plantios clonais de alto

rendimento/produktividade e resistênciã a adversos fatores, como clima, solo, água e outros. Nos últimos trinta anos, trabalhos de pesquisa e de melhoramento genético para a obtenção de maior ganho de produtividade, e praticamente dobraram (ABRAF, 2011). Os Estados do Paraná e Santa Catarina destacam-se por possuírem maior território de florestas plantadas de *Pinus*, ocupando 42,4% no Paraná e 34,1% em Santa Catarina dos plantios de *Pinus* no Brasil. (IBÁ, 2015).

2.2 *Pinus caribaea*

Pinus caribaea possui três variedades, as quais apresentam diferentes características morfológicas e são de diferentes regiões de origem. *Pinus caribaea* var. *bahamensis*, origina-se das Bahamas e das ilhas Turcas e Caicos, *Pinus caribaea* var. *caribaea* é originária do oeste de Cuba e a variedade *hondurensis* é originária de Honduras, Belize, Guatemala, El Salvador, Nicarágua e México. Essas variedades de *Pinus caribaea* possuem alto potencial para serem usadas em áreas de reflorestamentos localizadas em zonas quentes e livres de geada, sendo um dos gêneros mais estudados para a obtenção de maior qualidade de madeira e a otimização da produção.

Entre as três variedades, *hondurensis* é a que produz maior volume de madeira (SUASSUNA, 1977), maior disponibilidade de sementes e desenvolve bem em solos pobres (MORAES *et al.*, 2007). Considerado uma das espécies mais utilizadas em reflorestamentos em zonas tropicais de todo o mundo, devido a sua característica de adaptação que lhe permite se desenvolver desde o nível do mar até altitudes que chegam a 1000 m (FOELKEL, 2008), alcançando cerca de 30 metros de altura, podendo atingir uma altura considerável livre de galhos. Sendo considerada uma espécie que não tolera geadas, é plantada apenas na região tropical do Brasil (KRONKA, 2005). *Pinus caribaea* var. *hondurensis* é um dos *Pinus* mais plantados em áreas de reflorestamentos no Brasil, cobrindo uma área de mais de 700.000 ha do território brasileiro, indo desde a Amazônia até a região sudeste do país, pois tem como característica o fato de crescer melhor em zonas quentes, por possuir um crescimento rápido e superior às outras espécies

de *Pinus* (*Pinus taeda* e *P. elliottii*), que se desenvolvem melhor em menores temperaturas (FOELKEL e FOELKEL, 2008).

Apesar da grande potencialidade dessas árvores, as pesquisas sobre características e qualidade de *Pinus* spp ainda são escassas, sendo necessário um suporte da pesquisa a fim de garantir a continuidade desta atividade de forma sustentável (CHAVE *et al.*, 2003). Espécies de *Pinus* têm sido estudadas por pesquisadores em todo mundo, gerando maior valor econômico, maior sustentabilidade, além de diminuir ou até eliminar o conceito errôneo sobre má qualidade da madeira produzida por este gênero (TRIANOSKI, 2012).

Assim como para a maioria das espécies de *Pinus*, a propagação vegetativa de *P. caribaea* var. *hondurensis* apresenta uma série de limitações, o que representa um gargalo em programas de melhoramento desta espécie. Por isso, técnicas de cultura de tecidos podem representar ferramentas importantes na clonagem de genótipos elite e, entre elas, a embriogênese somática apresenta potencial para as espécies deste gênero, já sendo, inclusive, utilizada comercialmente.

2.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CONÍFERAS

Embriogênese somática (ES) é o processo pelo qual as células somáticas dão origem a embriões, sob condições favoráveis para a indução de células embriogênicas, passando por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas (QUIRÓZ-FIGUEROA *et al.*, 2006), num processo morfogenético que se aproxima da sequência de eventos representativos da embriogênese zigótica, por meio da técnica de cultivo *in vitro* (GUERRA *et al.*, 1999), resultando na produção de uma estrutura bipolar, sem conexão vascular com o tecido de origem (SOLÍS-RAMOS *et al.*, 2012).

A embriogênese somática pode ocorrer de maneira direta ou indireta. Na direta a ocorrência de proliferação celular para a formação do embrião somático é nula ou mínima, enquanto na embriogênese indireta um período maior de

condições adequadas é necessário e ocorre a proliferação de células indeterminadas antes da formação do embrião somático (HALPERIN, 1995).

O primeiro protocolo de regeneração *in vitro* através da embriogênese somática foi relatado em cenoura, *Daucus carota* (REINERT, 1958; STEWARD *et al.*, 1958). Desde então a regeneração por meio desta técnica foi relatada para várias espécies vegetais.

O processo de embriogênese somática em coníferas segue uma sequência de passos: iniciação e proliferação de culturas embriogênicas, diferenciação dos embriões iniciais e desenvolvimento dos embriões finais e cotiledonares (VON ARNOLD e CLAPHAM, 2008) (Figura 1) e estas fases foram também observadas, com algumas modificações, para outras coníferas importantes, como *Picea abies* e *Araucaria angustifolia* (STEINER *et al.*, 2015).

A formação de embriões somáticos em *Pinus* foi descrita pela primeira vez em *Pinus radiata* por SMITH *et al.* (1985). Após esse estudo, a embriogênese somática foi relatada em várias espécies deste gênero (ATTREE *et al.*, 1991; JOY *et al.*, 1991; JAIN *et al.*, 1995; VON ARNOLD *et al.*, 2002). No entanto, a técnica tem demonstrado ser bastante genótipo dependente, e o sucesso na obtenção de protocolos eficientes diferem bastante em relação às espécies. Enquanto para *P. taeda* a técnica pode ser considerada muito eficiente (PULLMAN *et al.*, 2006), já sendo aplicada em nível comercial em programas de melhoramento genético desta espécie, inclusive com patentes concedidas há décadas (US 5856191 A), para outras espécies, protocolos completos ainda não foram obtidos, ou apresentam baixa eficiência.

Em *Pinus caribaea*, foram relatados na literatura apenas três trabalhos, dois por NEUTELINGS *et al.* (1998) e MALABADI *et al.* (2011) e um para a variedade *hondurensis* reportado por DAVID *et al.* (1990), que obteve a embriogênese somática a partir de embriões imaturos e de protoplastos.

O processo de embriogênese somática para coníferas, de uma maneira geral, e para *Pinus* especificamente, pode ser dividido nas fases de indução, proliferação das culturas embriogênicas, pré maturação e maturação e conversão dos embriões em plântulas (VON ARNOLD *et al.*, 2002; VON ARNOLD e CLAPHAM, 2008).

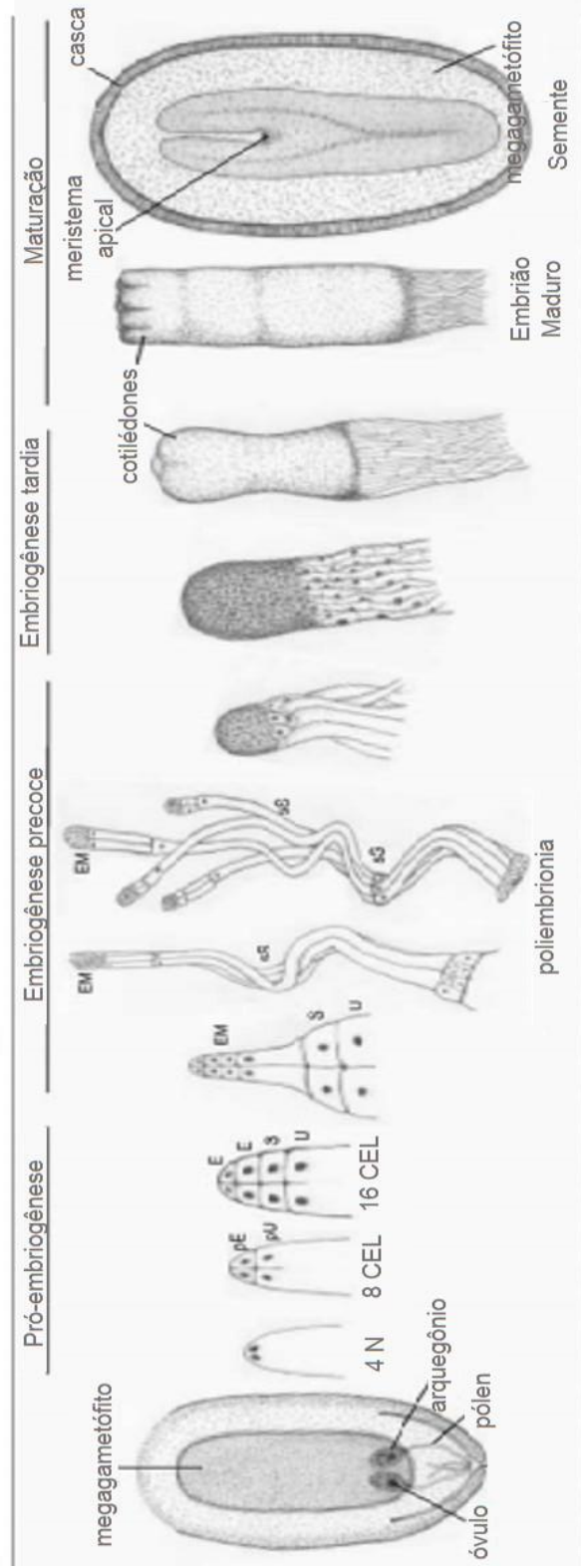


FIGURA 1 - Etapas da embriogênese somática em gimnospermas (*Piceaceae*). Abreviaturas: pU – nível primário, pE – nível da embriogênese primária, E – células embriogênicas, S – células do suspensor, EM – culturas embriogênicas, sS – suspensor secundário. (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

Estas fases costumam ser caracterizadas também por diferenças significativas nos meios de cultura. Na fase de indução, a auxina é considerada o hormônio mais importante na regulação da embriogênese somática (COOKE *et al.*, 1993). O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é a auxina sintética mais utilizada para a indução de culturas embriogênicas em *Pinus* (SILVEIRA, 2001; JAIN e GUPTA, 2005; MIGUEL *et al.*, 2004; MALABADI *et al.*, 2005; GARCIA, 2009).

Auxinas e citocininas são fatores chaves na determinação da resposta embriogênica, pois atuam na regulação do ciclo e na divisão celular necessária para a indução da embriogênese somática (FEHÉR *et al.*, 2003). Vários estudos apontam o 2,4-D como a auxina mais indicada na indução e crescimento do calo, por ser mais eficaz. O 2,4-D sozinho pode ser usado para proliferar culturas embriogênicas, mas não no desenvolvimento de embriões (STASOLLA, 2010), sendo necessário um balanço adequado de auxina com citocinina no meio para a formação de embriões somáticos.

Na maturação de culturas embriogênicas é necessário o uso de reguladores de crescimento e agentes osmóticos adicionados no meio de cultura, induzindo a progressão do desenvolvimento dos embriões somáticos (STASOLLA *et al.*, 2003). O regulador vegetal mais utilizado nesta fase é o ácido abscísico (ABA) (PRAKASH *et al.*, 2010), atuando na eliminação das células do suspensor das estruturas embriogênicas (STEINER *et al.*, 2008) na regulação da síntese de proteínas de reserva (DODEMAN *et al.*, 1997) e na divisão celular para a conclusão do desenvolvimento do embrião.

Reguladores vegetais nessa fase de maturação tem como propósito uma regeneração de alta frequência de embriões somáticos uniformes e de tecidos bem diferenciados (ZHANG *et al.*, 2005). Estudos mostraram que a combinação do ABA com o agente osmótico polietilenoglicol (PEG) na fase de maturação tem se mostrado eficiente em várias espécies florestais (STASOLLA *et al.*, 2003; STEINER *et al.*, 2007 e 2008) e uma de suas funções é prevenir a germinação precoce dos embriões (FÉHER, 2005). Sendo assim, o PEG é o agente osmótico mais utilizado na embriogênese somática devido ao seu caráter não plasmolisante (STASOLLA *et al.*, 2003).

A conversão dos embriões é considerada a etapa da transformação dos embriões em plântulas, onde se realiza uma série de eventos, como germinação, crescimento e desenvolvimento do sistema radicular e a emissão do primeiro par de folhas verdadeiras, ou seja, formação de uma planta completa e com fenótipo normal (REDENBAUGH *et al.*, 1988). O estabelecimento completo de protocolos para a regeneração de plantas a partir de embriogênese somática é essencial para obter o sucesso esperado, porém estudos que atingem e estabelecem esta etapa são escassos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDOS E MATERIAL VEGETAL

Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Florestas, Colombo-PR, utilizando-se sementes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* colhidas em 2009 em Ventania-SP, armazenadas a 4°C e cedidas pelo Laboratório de Sementes Florestais da Embrapa Florestas (Colombo-PR).

4.2 DESINFESTAÇÃO E INTRODUÇÃO *IN VITRO*

Após a armazenagem em geladeira por no mínimo um mês, as sementes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* foram mantidas em água corrente por 30 minutos e, em câmara de fluxo laminar, desinfestadas por meio de imersão em álcool 70% por 40 minutos, seguido por imersão em solução de cloreto de mercúrio (HgCl_2) a 0,1% por 20 minutos e lavadas três vezes com água deionizada autoclavada.

4.3 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

4.3.1 Meios de cultura combinados ou não com ácido fólico para indução da embriogênese somática

Após a separação do megagametófito (endosperma + embrião) dos demais componentes da semente, os megagametófitos maduros foram inoculados em três formulações de sais: DCR (GUPTA e DURZAN, 1985), QL (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977) e WV5 (COKE, 1996), combinados ou não com $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de ácido fólico. As vitaminas e compostos orgânicos foram tiamina, piridoxina, ácido

nicotínico e a glicina no meio DCR e tiamina nos meio QL e WV5 (Tabela 1). Os meios foram suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de glutamina, 1 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,5 g L⁻¹ de mio-inositol, 6,5 g L⁻¹ de ágar Kasvi®, 10 µM de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e 4 µM de benzilaminopurina (BAP). Os meios foram vertidos (25 mL) em placas de Petri (92 x 16 mm).

TABELA 1 – Composição iônica dos sais e concentrações das vitaminas dos meios de cultura utilizados para indução de embriogênese somática em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

Componentes (mM)	DCR	QL	WV5
NH ₄ ⁺	5,00	5,00	11,3
NO ₃ ⁻	10,48	34,0	16,9
Total N	15,48	39,0	28,2
K ⁺	4,7	19,4	19,8
Ca ⁺⁺	3,0	5,00	4,08
Mg ⁺⁺	1,5	1,50	7,75
SO ₄ ⁻	1,76	1,50	1,76
PO ₄ ⁻	1,25	1,90	1,98
Cl ⁻	1,16	0,0002	0,0204
Na ⁺⁺	0,2	0,200	0,2
P ⁺⁺	0,100	0,100	0,100
Mn ⁺⁺	0,132	0,005	0,090
Zn ⁺⁺	0,030	0,034	0,030
B	5,00	5,000	5,00
Cu ⁺⁺	0,100	0,100	0,100
MoO ₄ ⁻	1,61	1,000	1,03
Co ⁺⁺	0,105	0,100	0,105
Fe EDTA ⁻⁻⁻	0,110	0,100	0,110
Ni	0,193	-	-
Vitaminas (g L⁻¹)			
Tiamina	0,1	0,4	0,4
Piridoxina	0,05	-	-
Ác. Nicotínico	0,05	-	-
Glicina	0,2	-	-

O delineamento experimental utilizado foi um arranjo bifatorial, considerando os meios de cultura (DCR, QL e WV5) combinados ou não com ácido fólico (0 e 100 mg L⁻¹). Cada tratamento continha 10 repetições, sendo a unidade experimental uma placa de Petri com 20 explantes. O experimento foi repetido uma vez. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett, ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando o programa Assistat® (p<0,05).

4.3.2 Tipo de explantes

Após a assepsia descrita no item 4.2, as sementes foram inoculadas em placas de Petri (92 x 16 mm) contendo meio de germinação constituído de água e 7 g L⁻¹ de ágar Kasvi®, conforme resultados preliminares. Depois da germinação das sementes (21 dias após a inoculação), as plântulas foram excisadas com comprimento de aproximadamente 1 cm e as acículas, hipocótilos e raízes foram usados como explantes para indução da E.S. Também foram usados megagametófitos para indução da E.S. Todos os explantes foram inoculados em meio de indução ES1 (Tabela 2). Os explantes foram transferidos para meio ES1 fresco a cada 21 dias.

O delineamento foi inteiramente casualizado, cada tratamento continha 10 repetições, sendo cada repetição composta por 1 placa de Petri com 10 explantes cada. O experimento foi repetido 1 vez. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett, ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando o programa Assistat® (p<0,05).

TABELA 2 - Composição dos meios de cultura utilizados nas etapas da embriogênese somática para *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. (g L⁻¹).

Constituinte	Meio de Indução e Manutenção ES1	Meio de Pré-maturação ES2	Meio de Maturação ES3
Sais	QL	QL	QL
Tiamina HCl	0,4	0,4	0,4
Glutamina	1	1	1
Caseína hidrolisada	1	1	1
Glicina	1	1	1
Mio-inositol	0,5	0,5	0,5
Ácido fólico	0,1	0,1	0,1
Sacarose	30	30	30
Agar	6,5	6,5	6,5
Carvão Ativado	-	1,5	1,5
PEG 3350	-	-	10%
Reguladores vegetais (µM)			
2,4-D	10	-	-
BAP	4	-	-
ABA	-	-	120

4.3.3 Combinações de 2,4-D e BAP

Megagametófitos maduros foram inoculados em placas de Petri contendo 25 mL de meio ES1 (Tabela 2) e combinações de 2,4-D (0, 10, 20 e 30 µM) e BAP (0, 2, 4 e 8 µM) e foram transferidos para meio fresco a cada 21 dias

O delineamento experimental utilizado foi um arranjo bifatorial, considerando a concentração de 2,4-D (0, 10, 20 e 30 µM) e a concentração de BAP (0, 2, 4 e 8 µM). Cada tratamento continha 10 repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri com 10 explantes. O experimento foi repetido duas vezes. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett, ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando o programa Assistat® (p<0,05).

4.4 MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

4.4.1 Efeito do polietilenoglicol (PEG)

Os embriões somáticos, foram cultivados por 30 dias em placa de Petri contendo 25 mL de meio de pré-maturação ES2 (Tabela 2) e mantidas a 23 °C \pm 2°C, no escuro.

Após 30 dias, os embriões foram transferidos para meio de maturação ES3 (Tabela 2) em dois tratamentos sem e com adição de 10% de PEG 3500, e mantidos a 23°C \pm 2°C, no escuro.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Cada tratamento continha 10 repetições, sendo a unidade experimental uma placa de Petri com 20 explantes. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett, ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando o programa Assistat® ($p < 0,05$).

4.5 CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTURA

O pH dos meios foi ajustado em 5,8 antes da esterilização em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão, por 20 minutos.

Em todos os tratamentos e em todas as fases, as culturas foram realizadas em BOD, na ausência de luz em uma temperatura de 23 \pm 2°C.

4.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E CITOQUÍMICAS

Foram realizadas análises histológicas das culturas embriogênicas de diferentes explantes e dos embriões somáticos após 90 dias de cultivo no meio de 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 serie alcoólica (50%, 60% e 70%) por 10 minutos cada, e conservadas em álcool etílico 70%. Para realização dos cortes, as amostras foram pré infiltradas, infiltradas e emblocadas em historesina Leica®, seguindo as instruções do fabricante. Os blocos foram seccionados em seriados longitudinalmente no micrótomo rotativo manual

(Leica®). Para a visualização da formação estrutural dos calos e estruturas, os cortes foram corados com azul de toluidina 1% por 10 min (O'BRIEN *et al.*, 1981).

Para as análises histoquímicas, foram utilizados os cortes feitos em culturas embriogênicas após 90 dias em meio de maturação. A localização das proteínas foi detectada com azul de bromofenol (MAZIA *et al.*, 1953). Para a localização de amido, os cortes foram corados com lugol segundo JENSEN *et al.* (1962). As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus®) e as imagens capturadas em uma câmera fotográfica acoplada no mesmo microscópico do Laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA Florestas.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Amostras de calo embriogênico, não embriogênico, de embriões somáticos e zigóticos foram fixadas em FAA 50% por 24 horas, conforme metodologia anterior e posteriormente desidratadas em gradiente de etanol (50, 70, 80, 90 e 100%) onde permaneceram por 10 minutos em cada etapa, repetindo três vezes a desidratação em 100%. Após a bateria alcoólica, os materiais vegetais foram conduzidos ao aparelho de ponto crítico para total retirada de umidade dos materiais e, então, montados em “stubs” e coberto com ouro. As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40 no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

4.8 CURVA DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS EMBRIOGÊNICAS (MASSA SECA)

A pesagem das culturas embriogênicas iniciou-se com a introdução dos megagametófitos em meio de indução de embriogênese somática (ES1, Tabela 1) os quais foram mantidos a 23°C ±2°C, no escuro, transferindo-os para meio novo a cada 21 dias. As culturas embriogênicas foram retiradas aleatoriamente em quadruplicada nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120, pesados em balança analítica e levados a estufa de circulação de ar a 70°C por 72 horas ou até o peso constante dos calos. Ao final desse período, as culturas foram pesadas novamente e assim foi realizada a curva de crescimento das culturas crescidas em meio sólido de indução de embriogênese.

4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO

A partir do início da cultura de calos formados no megagametófito, quatro amostras de células dos calos em meio ES1 (Tabela 1) foram retiradas a cada 21 dias (21, 42, 63, 84, 105, 126, 147, 168, 189 e 210 dias), totalizando 40 amostras. As células foram coradas com carmim acético 2% por 1 minuto e lavadas com água destilada para a retirada de excesso de corante. Em seguida, adicionou-se o azul de Evans 0,1% por 30 segundos, repetindo o processo de lavagem do material com água destilada, conforme a metodologia adaptada de VALENTE (2007). A coloração das células foi visualizada em microscópio estereoscópio (Micronal[®]) e as imagens capturadas em uma câmera fotográfica acoplada no mesmo microscópio do Laboratório de Entomologia da EMBRAPA Florestas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

5.1.1 Efeito do meio de cultura e do ácido fólico

Não foi observada interação significativa entre meios e a presença de ácido fólico no meio de cultura para nenhuma das características avaliadas. No entanto, quando avaliados separadamente meio e presença de ácido fólico, houve diferença entre os tratamentos para formação de calos e formação de embriões somáticos anormais (Tabelas 3 e 4). A presença do ácido fólico nos meios de cultura permitiu uma maior formação de calos e favoreceu o aparecimento de embriões somáticos anormais em *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (Tabela 4).

Dos meios de cultura testados, o meio QL foi superior aos demais para as características avaliadas, embora não tenha diferido estatisticamente do meio WV5 para indução de calos (Tabela 3). A oxidação dos explantes não diferiu estatisticamente entre os tratamentos e variou de 10 a 18% nos meios QL com ácido fólico e WV5 com ácido fólico, respectivamente (dados não mostrados).

Culturas embriogênicas foram observadas após duas semanas de inoculação em todos os meios, suplementados ou não com ácido fólico. Culturas embriogênicas caracterizam-se por serem um aglomerado de células altamente friáveis, por possuírem coloração de esbranquiçada a translúcida e por apresentarem crescimento rápido (Figura 3 B). O início da indução das culturas embriogênicas foi observado a partir de calos formados na micrópila do megagametófito.

Após 90 dias, embriões somáticos anormais foram observados nas culturas embriogênicas em todos os meios de cultura que continham ácido fólico e no meio QL sem ácido fólico. O meio QL com adição de ácido fólico apresentou a maior porcentagem de embriões somáticos (10%).

TABELA 3 - Efeito de diferentes meios de cultura na calogênese e embriogênese somática de megagametófitos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* após 90 dias de cultura.

Tratamentos	Indução de calos* (%)	Culturas embriogênicas (%)	Número de embriões anormais por cultura
QL	37,0 ±17,03 a	6,0 ±5,16 a	5
DCR	22,0 ±13,17 b	1,0 ±3,16 b	1
WV5	29,0 ±18,53 ab	1,0 ±3,16 b	1

As variâncias foram homogêneas pelo teste de Bartlett. As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.* total de calos compactos e friáveis

TABELA 4 - Efeito da adição de ácido fólico (100 mg L⁻¹) na calogênese e embriogênese somática de megagametófitos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* após 90 dias de cultura.

Tratamentos	Indução de calos (%)	Culturas embriogênicas (%)
Com ác. fólico	42,0 ±13,20 a	4,66 ±5,16 a
Sem ác. fólico	16,6 ±9,00 b	0,66 ±2,58 b

As variâncias foram homogêneas pelo teste de Bartlett. As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Esse resultado foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos que apresentaram 2% de formação de estruturas somáticas. No meio QL, independentemente da adição de ácido fólico, houve formação de embriões somáticos anormais (5) (Tabela 3). Os meios DCR e WV5 com adição de ácido fólico apresentaram em média um embrião por cultura embriogênica (Tabela 3).

Os meios de cultura DCR e WV5 contêm maiores quantidades de sulfato, cloro, manganês, cobre, molibdato, cobalto e ferro e menores quantidades de cálcio, fosfato e nitrogênio em relação ao meio QL, e a quantidade de fósforo, boro, cálcio e zinco é a mesma nos três meios (Tabela 1). Os meios de cultura DCR, QL e WV5 contêm tiamina e o meio DCR tem menor quantidade de tiamina em relação ao QL e WV5. A glicina, o ácido nicotínico e a piridoxina estão presentes somente no meio DCR (Tabela 1) e, apesar disso, a indução de calos e na formação de embriões somáticos anormais não foram maiores no meio DCR.

O meio DCR vem sendo bastante aplicado na embriogênese somática para o gênero *Pinus*, já tendo sido usado para *P. nigra* (SALAJ *et al.*, 2014), *P. roxburghii* (ARYA *et al.*, 2000), *P. sylvestris* (ARONEN *et al.*, 2009), *P. patula* (MALABADI *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2001), *P. contorta* (PARK *et al.*, 2010) e *P. brutia* (YILDIRIM *et al.*, 2006). O meio QL foi usado na embriogênese somática do *P. radiata* (MONTALBAN *et al.*, 2010), *P. nigra* (RADOJEVIC *et al.*, 1999) e também para *Araucaria augustifolia* (SANTOS *et al.*, 2002). O meio WV5 foi empregado na embriogênese somática de *P. taeda* (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2011), *Pinus banksiana* (PARK *et al.*, 2006) e *P. pinea* (GARCIA, 2009).

Para embriogênese somática de *Pinus caribaea* foram utilizados os meios MSG (BECWAR *et al.*, 1990) (DAVID *et al.*, 1990; MALABADI *et al.*, 2011) e MS modificado (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (NEUTELINGS *et al.*, 1998) e, no presente trabalho, o meio QL foi utilizado pela primeira vez na embriogênese somática de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

A grande diferença do meio QL em relação aos meios DCR e WV5 é a maior concentração do nitrogênio total, sob a forma de nitrato de cálcio e nitrato de potássio, e menor concentração de nitrato de amônio (Tabela 1). O nitrogênio é o elemento de que as plantas mais precisam (GEORGE *et al.*, 2008) podendo ser suprido na forma de aminoácido, amônio (cátion) e de nitrato (ânion) e, na maioria das vezes, a razão entre as concentrações do NH_4^+ e do NO_3^- pode ser o fator determinante do crescimento, pois a assimilação das duas formas de nitrogênio causa o balanço cátion-ânion dentro da planta (EPSTEIN *et al.*, 2005). O meio QL apresenta a maior razão entre as concentrações do NO_3^- em relação ao NH_4^+ , com uma concentração 6 vezes maior de NO_3^- comparado ao NH_4^+ . A concentração de NO_3^- nos meios DCR e WV5 é de 2 e 1,5 vezes maior, respectivamente, que a concentração de NH_4^+ (Tabela 1).

A deficiência do NO_3^- inibe o crescimento vegetal (TAIZ *et al.*, 2013), o que pode estar relacionado com o fato dos outros meios terem porcentagem inferior de formação de embriões somáticos, considerando as exigências nutricionais da espécie.

Como, no meio QL, a quantidade de nitrogênio total é superior a dos demais meios, acredita-se que nos meios DCR e WV5 o ácido fólico pode ter

contribuído como fonte de nitrogênio, um dos elementos essenciais para a embriogênese somática.

Em *Pinus taeda*, o maior aumento na iniciação de culturas embriogênicas ocorreu na presença de ácido fólico no meio, combinado com MES e biotina (PULLMAN *et al.*, 2005). Conforme o aumento da concentração de ácido fólico, ocorre o aumento do crescimento de culturas embriogênicas, pois ácido fólico e biotina são considerados estimulantes em todas as etapas da embriogênese somática (PULLMAN *et al.*, 2005).

5.1.2 Efeito do tipo de explante

O teste de coloração indicou a presença de culturas embriogênicas em calos de todos os tratamentos. Para a variável indução de calos, o resultado obtido com megagametófitos diferiu estatisticamente dos demais e apresentou menor percentagem de indução de calos (40%), em relação aos demais que variaram entre 87 e 100% (Tabela 5).

No entanto, a indução de calos foi avaliada com relação a percentagem total dos explantes que formaram calos. Apenas o megagametófito apresentou formação de embriões somáticos anormais, concluindo que o explante inicial megagametófito maduro foi mais responsivo que os demais para a indução da embriogênese somática em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

Estes resultados corroboram os de outros autores, indicando que o megagametófito é o explante mais indicado para induzir a embriogênese somática. SMITH *et al.* (1985) relataram pela primeira vez a embriogênese somática (ES) em *Pinus radiata*, utilizando o megagametófito como explante inicial. Estudos realizados nas últimas décadas indicam também que, em *Pinus*, a embriogênese somática é mais eficiente se iniciada a partir de megagametófitos imaturos (MIGUEL *et al.*, 2004; MALABADI *et al.*, 2005; KLIMASZEWSKA *et al.*, 2007; TERESO *et al.*, 2007). No entanto, a embriogênese somática a partir de megagametófitos maduros já foi relatada (ATREE *et al.*, 1993; JAIN, *et al.*, 1995; SILVEIRA, 2001; MALABADI *et al.*, 2011b; CHAVEZ *et al.*, 2011) e nenhum

estudo utilizou a acícula, o hipocótilo ou a raiz de *Pinus*. Pois, diferentes tecidos da mesma planta ou em diferentes estádios de desenvolvimento podem responder de formas diferentes *in vitro*, principalmente em coníferas (JAIN *et al.*, 1995). Embora tenham sido observadas culturas embriogênicas em todos os explantes testados, em raízes, hipocótilos e acículas não houve formação de embriões somáticos.

TABELA 5 – Calogênese e embriogênese somática em diferentes explantes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* cultivados por 90 dias em meio QL (QUOIRIN E LEPOIVRE, 1977) adicionado de ácido fólico (100 mg L⁻¹).

Tipo de explante	Indução de Calos* (%)	Formação de embriões anormais** (%)	Taxa de Oxidação (%)
RAIZ	87,5 ±12,58 a	0 ±0	40,0 ±8,16 c
ACÍCULA	87,5 ±5 a	0 ±0	20,0 ±8,16 b
HIPOCÓTILO	100,0 ±0 a	0 ±0	0,0 ±0 a
MEGAGAMETÓFITO	40,0 ±8,16 b	8 ±0	10,0 ±8,16ab

** Total de calos compactos e friáveis. ** Estruturas avaliadas em explantes com calos. As variâncias foram homogêneas pelo teste de Bartlett. As médias na coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quanto à variável oxidação, houve diferença estatística entre o hipocótilo que não apresentou oxidação em relação aos explantes de raízes e acículas que apresentaram 40 e 20%, respectivamente, e esses resultados não diferiram estatisticamente da porcentagem obtida para o megagametófito (10%) (Tabela 5).

5.1.3 Efeito de combinações de 2,4-D e BAP

No experimento utilizando diferentes concentrações de 2,4-D combinado com BAP, depois de aproximadamente 2 semanas de cultura, calos começaram a surgir em alguns tratamentos, mas somente na 12^o semana os explantes desenvolveram calos em todos os tratamentos, com exceção no tratamento controle (Tabela 6).

Houve diferenças significativas entre os tratamentos para percentagem de calos produzidos, indicando que as combinações e concentrações de 2,4-D e BAP exercem um efeito significativo na indução de calos (Tabela 6). Um número significativamente maior de calos foi obtido quando megagametófitos maduros foram cultivados em meio QL suplementado com 10 μM de 2,4-D e 2 ou 4 μM de BAP. O meio que não continha qualquer regulador vegetal não produziu calo. Também foi calculada a média de embriões somáticos anormais que surgiram em cada calo e apenas nos tratamentos com 2,4-D (10 μM) com BAP (2 ou 4 μM) houve um número médio de 5 embriões anormais por massa.

TABELA 6 - Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e de BAP em meio QL adicionado de ácido fólico (100 mg L^{-1}) na indução de calos (%) em megagametófitos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* após 90 dias de cultura.

BAP (μM)	2,4-D (μM)			
	0	10	20	30
0	0,00 \pm 0,00bB	10,00 \pm 0,00cAB	14,00 \pm 5,48bA	18,00 \pm 8,37aA
2	12,00 \pm 4,47aC	46,00 \pm 5,48aA	30,00 \pm 10,0aB	28,00 \pm 8,37aB
4	14,00 \pm 5,48aC	56,00 \pm 5,48aA	30,00 \pm 10,0aB	28,00 \pm 4,47aB
8	14,00 \pm 5,48aB	28,00 \pm 4,47bA	24,00 \pm 11,40abAB	24,00 \pm 5,48aAB

* Estruturas avaliadas em explantes com calos. As variâncias foram homogêneas pelo teste de Bartlett. As médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Nos tratamentos onde foi aplicada maior concentração de 2,4-D combinado com BAP, a indução foi inibida. O balanço auxina e citocinina regula a morfogênese vegetal e, em certos níveis, é fator chave na determinação da resposta da embriogênese porque participa na regulação do ciclo e da divisão celular (CARVALHO *et al.*, 2006).

Nesse parâmetro a análise de regressão indicou um polinômio de segundo grau como sendo a equação que melhor descreveu a percentagem da indução dos calos (Figura 2).

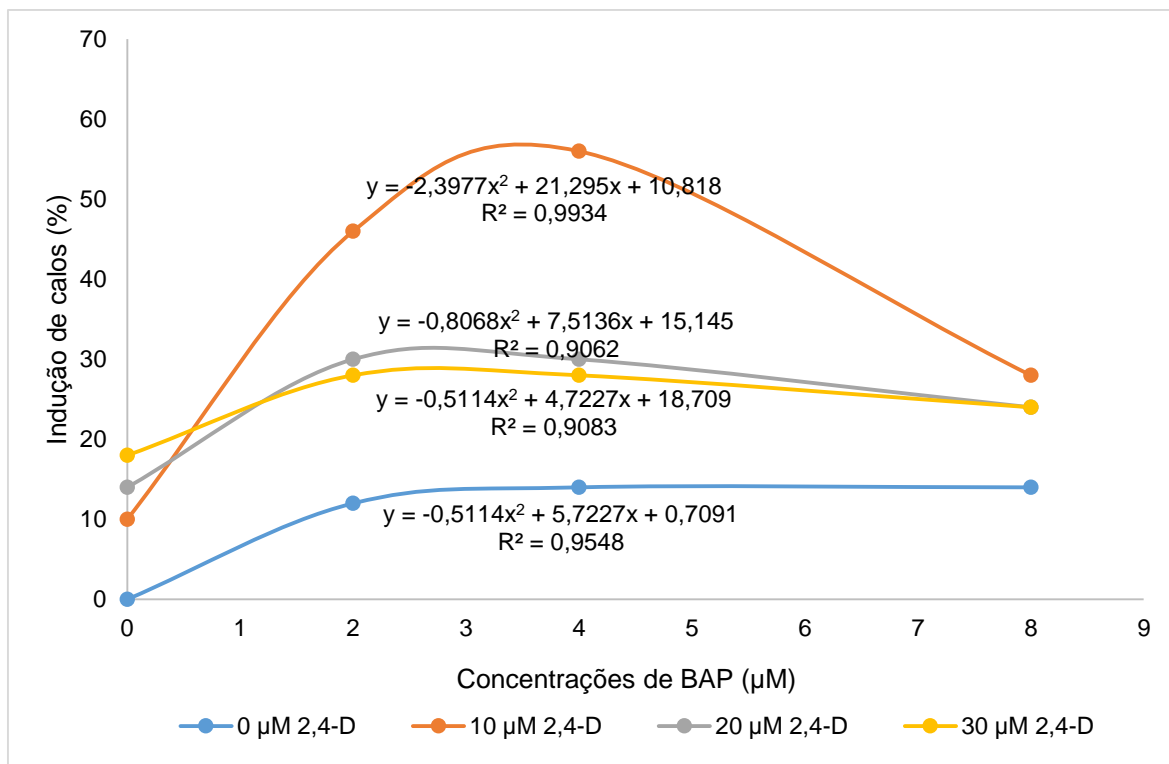


Figura 2 - Percentagem de indução dos calos em megagametófitos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* em função de diferentes concentrações de BAP combinados com diferentes concentrações de 2,4-D após 90 dias de cultura.

De acordo com a figura 2, a percentagem de indução de calos aumentou à medida que se aumentou a concentração de BAP nos tratamentos, até o valor de 2 µM de BAP. A partir desse valor a percentagem de indução de calor tendeu a se estabilizar, mostrando que não há necessidade de concentrações elevadas de BAP para os tratamentos com 2,4-D, exceto no tratamento que utilizou 10 µM de 2,4-D. Nesse caso, a indução de calos continuou aumentando até a concentração de 3,5 µM de BAP, onde atingiu seu ponto ótimo de crescimento. A partir desse valor, a percentagem de indução de calos nesse tratamento começou a entrar em declínio.

Considerando que o efeito combinado de 2,4-D (10 µM) com BAP (2 a 4 µM) resultou na maior taxa de explantes formando calos e no maior número de calos com embrião somático (46 e 56%, respectivamente), estes foram considerados os melhores tratamentos (Tabela 6). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos de embriogênese somática *in vitro* de *Pinus taeda* utilizando as mesmas concentrações de 2,4-D (10 µM) e de BAP (4 µM)

(SILVEIRA, 2001; JAIN e GUPTA, 2005) e estudos utilizando concentrações próximas, como 9 μM de 2,4-D e 2,2 μM de BAP e 8 μM de 2,4-D e 4 μM de BAP para *P. pinea* (GARCIA, 2009), 13,6 μM de 2,4-D e 4,4 μM de BAP para *P. pinaster* (MIGUEL *et al.*, 2004). Para *P. patula*, as concentrações de 20 μM de 2,4-D e 9 μM de BAP, tiveram que ser utilizadas (MALABADI *et al.*, 2005). O 2,4-D sozinho pode ser empregado para a proliferação de culturas embriogênicas, mas não no desenvolvimento de embriões (STASOLLA, 2010).

Estas observações demonstraram que o balanço adequado de auxina com citocinina no meio é essencial para a indução de calos a partir de megagametófitos maduros de *Pinus*.

5.2 MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

5.2.1 Efeito do PEG

Na embriogênese somática, a fase de maturação é uma etapa pela qual os embriões precisam passar para terminar de se desenvolver e, posteriormente, germinar e assim possam formar uma plântula. Após 30 dias no meio ES3 (Tabela 2) não foi observada nenhuma mudança na cor nem na forma dos embriões anormais. A mudança começou a surgir 60 dias após a introdução dos embriões anormais no meio de maturação. Em meio contendo 120 μM de ABA, 50% dos embriões anormais alteraram sua forma, alongando ou achatando seu ápice e destes 30% mudaram a cor, passando para um tom amarelado.

Em meio contendo 10% de PEG-3500 e 120 μM de ABA, 30% dos embriões anormais mudaram de forma e destas 20% mudaram de cor, adquirindo um tom amarelado. Aos 90 dias, não houve mudança nos embriões, na forma nem na cor. Dos embriões anormais que sofreram alteração de cor avaliada anteriormente, 10% e 40% oxidaram, respectivamente, nos tratamentos com 120 μM de ABA e 10% com PEG-3500 + 120 μM ABA.

O PEG-3500 adicionado ao meio de maturação causou efeito deletério nos embriões somáticos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Esses resultados corroboram o que foi descrito por XIN *et al.* (1997) onde, com adição de PEG 10%

houve uma diminuição significativamente da maturação dos embriões comparados a embriões no meio com 10 mg L⁻¹ de ABA.

Em estudos com *Pinus pinaster*, o PEG-4000 foi utilizado com sucesso durante a maturação dos embriões pré-cotiledonares (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Em outro trabalho com *P. pinaster* utilizou-se 120 µM de ABA suplementado de 100 gL⁻¹ PEG, resultando no melhor tratamento, com 29% de formação de linhagens embriogênicas (MIGUEL *et al.*, 2004).

O agente mais eficiente na maturação para *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, dentre os testados foi o ABA (120 µM). KLIMASZEWSKA e SMITH (1997) também tiveram o melhor resultado com 120 µM de ABA no meio de maturação de *Pinus*.

Em outras espécies de *Pinus*, tais como *P. armandii* (MARUYAMA *et al.*, 2007), *P. brutia* (YILDIRIM *et al.*, 2006) e *P. patula* (JONES *et al.*, 2001), o PEG foi empregado com sucesso na fase de maturação de embriões. No presente trabalho, após 90 dias não foram observados embriões na fase cotiledonar assim como observado para as espécies de *Pinus indicadas acima*. A fase de maturação é um dos principais gargalos nos protocolos de embriogênese somática, uma vez que os embriões param de se desenvolver e apresentam anormalidades anatômicas (MIGUEL *et al.*, 2004).

5.3 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL, CORTES HISTOLÓGICOS E ESTUDO HISTOQUÍMICO DE AMIDO E PROTEÍNA

Assim que se iniciou a calogênese, foi possível a visualização dos calos não embriogênicos (Figura 3 A) que apresentaram uma coloração escura e opaca e de textura mais compacta diferenciando-se dos calos embriogênicos que foram obtidos em todos os tratamentos com coloração branca, translúcida e de aspecto friável (Figura 3 B), característico de culturas embriogênicas.

A análise estrutural dos calos, por meio da microscopia eletrônica de varredura, permitiu confirmar a presença de células embriogênicas, por meio da visualização de células isodiamétricas, As células isodiamétricas em culturas embriogênicas diferenciaram das células irregulares e maiores observadas em calos sem a capacidade embriogênica.

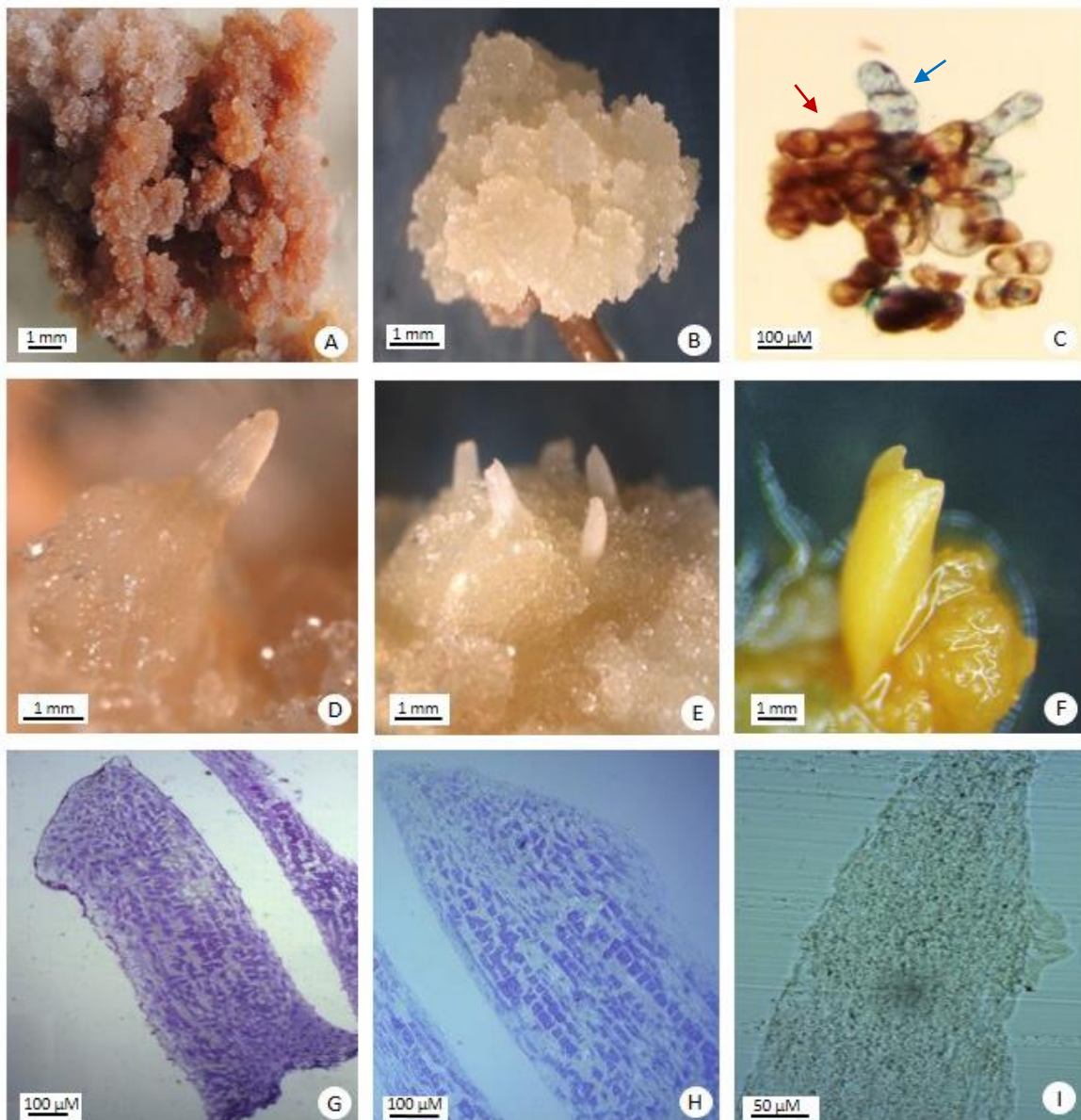


Figura 3 – Aspectos de morfogênese da embriogênese somática de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, coloração de células de embriogênicas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, Cortes histológicos de estruturas embriogênicas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* e análises histoquímicas de amido e proteína. Células que perderam a capacidade embriogênica (A); Culturas embriogênicas no início (21 dias) da embriogênese somática (B); Pró-embrião formado a partir de megagametófito, corado com carmim acético e azul de Evans onde mostra células somáticas (seta vermelha) e células do suspensor (setas azuis) (C); Morfogênese da embriogênese somática de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* no início da formação da estrutura embriogênica (D); Formação de vários embriões na cultura embriogênica (E); Embrião somático anormal no meio de maturação, após 90 dias em meio ES4 (F); Corte histológico de estrutura embriogênica (G); Proteínas em embriões somáticos corados com azul de bromofenol (H); Grãos de amido em embriões somáticos corados com Lugol (I). Créditos: Neusa Steiner (Foto C).

O teste histoquímico confirmou a presença de pró-embriões em todos os tratamentos de todos os experimentos, confirmando a formação de pró-embrião (Figura 3 C), com células somáticas (seta vermelha), agrupadas e arredondadas e células do suspensor (setas azuis), mais alongadas nas culturas embriogênicas.

A formação das culturas embriogênicas teve início no meio de indução partir de 30 dias após o início do experimento e, após 60 dias, já pode-se observar a formação de células embriogênicas e células do suspensor (Figura 3 D) nas culturas embriogênicas. Após 90 dias foi visualizado embriões somáticos anormais na fase da embriogênese final (Figura 3 E).

Após a transferência dos embriões somáticos para meio de cultura de maturação, estes são submetidos a estresse osmótico devido à adição de PEG no meio. Esse estresse é importante para o desenvolvimento dos embriões nesta etapa, promovendo a formação de cotilédones anormais (Figura 3 F) além de provocar mudanças na morfogênese da estrutura.

Cortes histológicos de embrião somático revelaram células arredondadas em culturas embriogênicas com citoplasma denso como também relatado em embriões somáticos de *Pinus sylvestris* (HOHTOLA, 1995), entretanto, pode-se observar que não há conexão vascular com as culturas embriogênicas (Figura 3 G), os embriões somáticos não mostraram crescimento apical e nem radial durante todo o processo de indução, no ápice do embrião não observa-se nem a organização das células meristemáticas, resultando assim em embriões anormais.

Para assegurar a formação de embriões somáticos normais em várias espécies de plantas devem-se manter o nível de auxina baixo (KORLACH *et al.*, 1995; FIND *et al.*, 2002; ABRAHAMSSON *et al.*, 2012), porém ao diminuir a concentração da auxina no meio, aumentou significativamente a oxidação das culturas embriogênicas.

A auxina desempenha um papel essencial na embriogênese, principalmente no desenvolvimento da polaridade da estrutura (LARSSON *et al.*, 2008) e, sem a polaridade, a estrutura se mostra ausente de meristemas (Figura 3 G), sendo a padronização apical-basal durante a embriogênese determinante para a obtenção de embriões somáticos normais de *Pinus* (FILONOVA *et al.*, 2000).

Foi notada a formação de meristemóides em culturas embriogênicas provenientes de acículas, resultando num tecido com potencial embriogênico, conforme foi relatado em *Eucalyptus urophylla* (TREVIZAN *et al.*, 2011).

Corpos proteicos foram observados ao longo do embrião somático (Figura 3 H), como foi reportado por outros autores em *P. taeda* (KING *et al.*, 1997 e STONE *et al.*, 1999) e em *P. pinaster* (TERESO *et al.*, 2007). Em embriões somáticos maduros e bem desenvolvidos, corpos proteicos são bastante abundantes (TERESO *et al.*, 2007). Concentrações de proteínas armazenadas em embriões somáticos poderão ser um marcador da qualidade do embrião, como foi sugerido para *P. strobus* (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2004) e *P. pinaster* (TERESO *et al.*, 2007).

Na extremidade apical do embrião somático, foi observado um acúmulo de grânulos de amido (Figura 3 I), o mesmo descrito em embriões somáticos da *Picea glauca* (JOY *et al.*, 1991), *Picea abies* e *Pinus pinaster* (LIPAVSKÁ *et al.*, 2000; TERESO *et al.*, 2007).

5.4 CURVA DE CRESCIMENTO (MASSA SECA) E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE EMBRIOGÊNICA.

A curva de crescimento de calos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* foi determinada num período de 120 dias e, apesar da cinética da curva de crescimento dos calos se diferenciar em seis fases, somente cinco foram detectadas (Figura 4), mesmo que, no final desse período (V), os calos já apresentavam alterações visíveis da sua coloração, ficando mais escuros.

O crescimento das células embriogênicas é devido às divisões celulares que compreende desde a indução da divisão celular ao estágio final onde a divisão celular é reduzida ou cessada (STREET, 1977). No início (I) as células dividem-se lentamente, pois inicia-se a síntese de proteínas e metabolitos específicos. A fase “lag” se deu até o 15º dia do início do experimento. Nas fases II e III, ambas na fase “log”, ocorre um crescimento exponencial e linear das células, respectivamente, num curto espaço de tempo. É na fase linear (III) que as células adquirem competência e que se pode proceder à repicagem (GUERRA *et al.*, 2006).

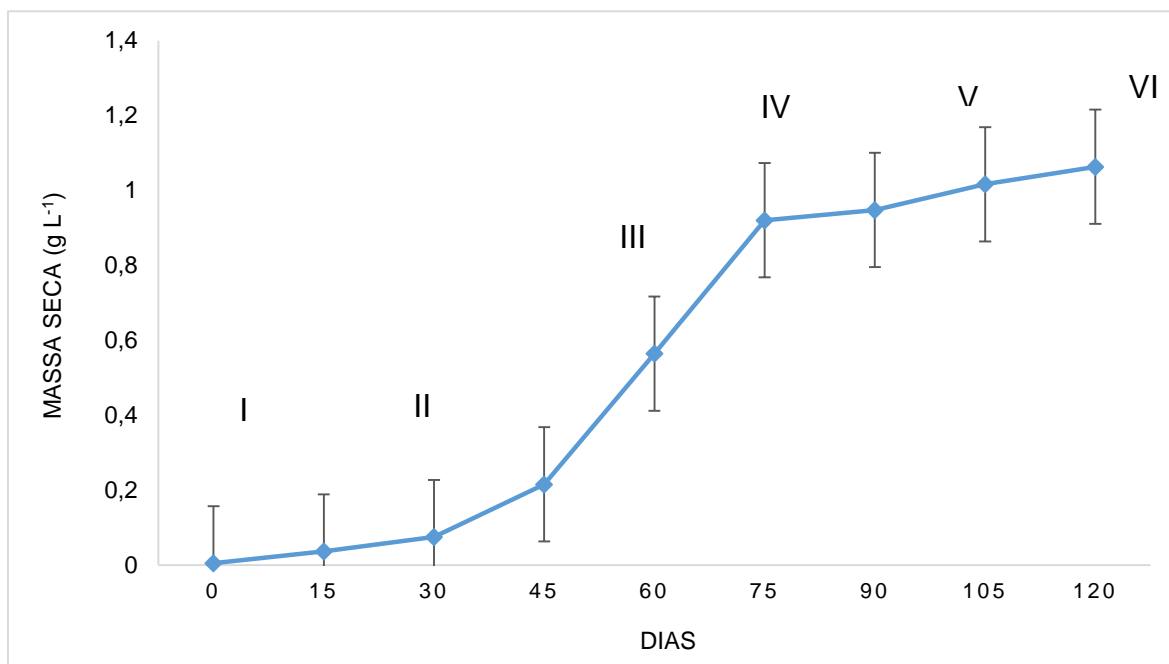


FIGURA 4 – Curva de crescimento de culturas embriogênicas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* cultivadas em meio ES1 (massa seca).

Na fase de desaceleração (IV), as células reduzem sua capacidade de divisão celular, sendo esta a última etapa para proceder à repicagem. Através da subcultura de um pequeno grupo destas células é possível manter a cultura de células e assim este procedimento pode ser mantido indefinidamente (STREET, 1977). A repicagem deve ser terminada ainda no início da fase estacionária (V) quando não há divisão celular. Nesta fase, as células tendem a ter menores taxas de divisão devido a uma competição entre elas, as culturas não podem ser mantidas nessa fase por um período longo. Na fase de declínio ou morte celular (VI) as células reduzem sua divisão celular ou até mesmo cessam essa divisão, ocasionando a lise celular (GUERRA *et al.*, 2006).

A curva de crescimento foi estabelecida afim de encontrar o melhor período para a repicagem (subcultura). Para o *Pinus caribaea* var. *hondurensis* a fase exponencial começa a partir do 15º dia do início do experimento e a fase linear nos dias 15 a 70 após o início da indução da embriogênese somática, sendo este o melhor período para a repicagem da cultura embriogênica.

Já no experimento da avaliação da capacidade embriogênica, após a oitava repicagem, 168 dias após o início do experimento, as células

embriogênicas começaram a mostrar sinais da perda da capacidade embriogênica com menor taxa de células embriogênicas e com aspecto de calos esbranquiçados e menos friáveis. Ao longo das repicagens, estas células foram perdendo sua capacidade embriogênica gradativamente até a perda dessa capacidade, observada visualmente pelo escurecimento dos calos e aspecto mais compacto. A coloração azul é observada apenas em culturas não embriogênicas.

É importante determinar o número máximo de subcultivos permitidos para que culturas embriogênicas mantenham sua capacidade embriogênica ao longo dos subcultivos. No entanto, GUERRA *et al.* (1999) recomendam a realização de repicagens para que ocorra a purificação e estabilização de culturas embriogênicas. Com isso, a determinação da perda da capacidade embriogênica é fundamental para fornecer informações sobre as condições de cultivo. Neste caso, a caracterização citoquímica mostrou que até o 7^o subcultivo células de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* mantem a capacidade embriogênica. As recomendações de outros autores é de não realizar mais de seis subcultivos na embriogênese somática.

6. CONCLUSÃO

- Para a primeira etapa do processo de embriogênese somática de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, recomenda-se a utilização do megagametófito maduro como explante inicial e o meio de cultura QL com adição de 100 mgL⁻¹ de ácido fólico, 10 µM de 2,4-D e 2 µM de BAP.

- É possível a obtenção de culturas embriogênicas a partir de acículas, hipocótilos e raízes de plântulas recém germinadas de *P. caribaea* var. *hondurensis*.

- O ácido fólico apresenta efeito positivo na indução da embriogênese somática de *P. caribaea* var. *hondurensis*.

- Nas condições testadas, não é possível a obtenção de embriões somáticos normais na fase cotiledonar.

- Na concentração testada, o PEG3500 não é eficiente na maturação e conversão dos embriões somáticos.

7. REFERÊNCIAS

ARONEN, T.; PEHKONEN, T.; RYYNÄNEN, 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, I.D. Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg. **Plant Cell Reports**, v.19 p.775-780, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL (BRACELPA). **Relatório Estatístico 2009/2010**. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/rel2010.pdf>>. Acesso em: 23 abril 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). **Anuário estatístico da ABRAF 2011 ano base 2010**. Brasília: ABRAF, 2011. Disponível em: <http://www.reformaagrariaemdados.org.br/biblioteca/caderno-de-estudo/anu%C3%A1rio-estat%C3%ADstico-da-abraf-2011-ano-base-2010>. Acesso em: 10 mai. 2016.

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.

ATTREE, S. M.; MOORE, D.; SAWHNEY, V. K.; FOWKE, L. C. Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos: effects of non-plasmolysing water stress and abscisic acid. **Annals of Botany**, v.68, p.519-525. 1991.

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

CAIRNEY, J.; PULLMAN, G. S. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. **New Phytologist**, v.176. p.511-536. 2007.

CAZOTO, J. L. **Expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário zigótico e somático em *Passiflora edulis***. Tese. Doutorado em Biologia Vegetal. Universidade Estadual de Campinas: Campinas-SP. 2012.

CHAVE M. M.; MAROCO J. P.; PEREIRA J. S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v.30 p.239-264. 2003.

CHAVE, J.; ANDALO, C.; BROWN, S.; CAIRNS, M.A.; CHAMBERS, J. Q.; EAMUS, D.; FOLSTER, H.; FROMARD, F.; HIGUCHI, N.; KIRA, T.; LESCURE, J.P.; NELSON, B. W.; OGAWA, H.; PUIG, H.; RIERA, B.; YAMAKURA, T. Tree allometry and improved estimation of carbon stocks and balance in tropical forests. **Oecologia**, v.145 p. 87–99. 2005.

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

COKE, J. E. Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of loblolly pines. **USA Patent** 5.534.433, 1996.

COOKE, T. J.; RACUSEN, R. H.; COHEN, J. D. The role of auxin in plant embryogenesis. **Plant Cell**, v.5, p.1494–1499, 1993.

DAVID, A.; LAINE, E.; DAVID, H. Somatic Embryogenesis in *Pinus caribaea*. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. Somatic Embryogenesis in Woody Plants. **Forest Sciences: Volume – 3 Gymnosperms**. v.44 p.145-181. 1995.

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

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives**. Sinauer Associates. Sunderland – Massachusetts. v.2, p.380, 2005.

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.

FILONOVA, L. H.; BOZHKOVA, P.V.; BRUKHIN, V.B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; VON ARNOLD, S. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryo in the gymnosperms, Norway spruce. **Journal of Cell Science**, v.113 p.4399–4411, 2000.

FIND, J.; GRACE, L.; KROGSTRUP, P. Effect of anti-auxins on maturation of embryogenic tissue cultures of Nordmanns fir (*Abies nordmanniana*). **Physiologia Plantarum**, v.116 p.231–237, 2002.

FOELKEL, C. Os *Pinus* no Brasil: *Pinus caribaea* e suas três variedades: *caribaea*, *bahamensis* e *hondurensis*. **PinusLetter**, Disponível em: http://www.celso-foelkel.com.br/pinus_08.html#quatorze. 2008. Acesso em: 30 jul 2016.

FOELKEL, E.; FOELKEL, C. O conceito de espécies invasivas ou invasoras em relação aos *Pinus*. **PinusLetter**, Disponível em: http://www.celso-foelkel.com.br/Pinus_04.html#quatorze. 2008. Acesso em: 25 mai 2016.

FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M.; MORAIS, E.; ZANATTO, A. C. S. SOUSA, C. M. R.; LEMOS, V. Parâmetros genéticos em progênies de polinização aberta de *Pinus caribaea* var. *bahamensis*, aos 22 anos. **Revista Instituto Florestal**, v.17, p. 103-111, 2005.

GARCIA, E. C. **Embriogénesis somática en pino piñonero (*Pinus pinea* L.)**. Tese. Departamento de Biología Celular e genética. Universidad de Alcalá: Alcalá de Henares, Espanha. 2009.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure – background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture** v.1. **Dordrecht: Springer**, 2008.

GUERRA, M. P.; NODARI, R.O. - **Introdução ao conceito de Biotecnologia**. Apostila. Universidade Federal de Santa Catarina: LFDGV. Florianópolis-SC. 2006.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília: EMBRAPA – CNPH. p. 533-568. 1999.

GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. Shoot multiplication from mature Douglas-fir and sugar pine. **Plant Cell**, v.4, p.177-179. 1985.

HOHTOLA, A. **Somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.)**. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Forest Sciences: Volume 3. Gymnosperms, v.44, p.269-287. 1995.

INDUSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ). Brazilian tree industry. **O setor brasileiro de árvores plantadas**. Disponível em: http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf. 2015. Acesso em: 27. Abr. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2013/>. 2013. Acesso em: 03 mai 2016.

JAIN S.M., ISHII K. **Recent advances in somatic embryogenesis in forest**. In: BURNS, B.; TRAGARDH, D.; MANTELL, S.H. Recent Advances in Biotechnology for Trees Conservation and Management. National Foundation for Science, Stockholm Sweden. 1999.

JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. **Forest Sciences**: Volume – 1. p.95-106, 2005.

JAIN, S. M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. Somatic Embryogenesis in Woody Plants. **Forest Sciences**: Volume – 3 Gymnosperms. v.44. 1995.

JIMÉNEZ, V. M.; BANGERTH, F. Relationship between endogenous hormone levels in grapevine callus cultures and their morphogenetic behaviour. **Vitis**, v.39, p. 151–157. 2000.

JONES, N. B.; VAN STADEN, J. Improved somatic embryo production from embryogenic tissue of *Pinus patula*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.37, p.543–549, 2001.

JOY R.W.; YEUNG, E.C.; KONG L, THORPE TA. Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.27, p.32–41, 1991.

KLOCK, U. **Qualidade da madeira de *Pinus oocarpa* Schiede e *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barr e Golf**. Dissertação. Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná: Curitiba-PR. 1989.

KORLACH, J.; ZOGLAUR, K. Developmental patterns during direct somatic embryogenesis in protoplast cultures of european larch (*Larix decidua* Mill.). **Plant Cell Reports**, v.15 p.242–247, 1995.

KRONKA, F. J. N. Inventário florestal da vegetação natural do Estado de São Paulo. **São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente/ Instituto Florestal**, 200p. 2005.

LARSSON, E.; SITBON, F.; LJUNG, K.; VON ARNOLD, S. Inhibited polar auxin transport results in aberrant embryo development in Norway spruce. **New Phytologist**, v.177 p.356–366, 2008.

LIPAVSKÁ, H, H.; SVOBODOVÁ, J.; ALBRECHTOVA, L.; KUMSTÝROVÁ, M.; VONDRÁKOVÁ, Z. Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.36 p.260-267, 2000.

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. 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.

MAZIA D.; BREWER, P. A.; ALFERT, M. The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. **Biological Bulletins**, v.104, p.57- 67, 1953.

MORAES, A.; CARVALHO, P.C. de F.; PELISSARI, A.; ALVES, S. J.; LANG, C. R. Sistemas de integração lavoura-pecuária no Subtrópico da América do Sul: exemplos do Sul do Brasil. *In: Simpósio Internacional em integração lavoura-pecuária*, Universidade Federal do Paraná: Curitiba-PR. 2007.

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.

PRAKASH M.G.; GURUMURTHI K. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture**, v.10 p.3-20. 2010.

QUIRÓZ-FIGUEROA F.R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZAVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86 p. 285-301. 2006.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, v.78, p.437-442, 1977.

REDENBAUGH, K.; FUJII, J.A.; SLADE, D. **Encapsulated plant embryos**. *In: MIZRAHI, A. (Ed.) Biotechnology in agriculture*. Editor: LISS A. R, p. 225-248, 1988.

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, v.45 p.244-245. 1958.

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Efeito do 2,4-D na Indução de Calos *in vitro* de Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 498-500, 2007.

SILVEIRA, V. Indução e controle da embriogênese somática em *Pinus taeda* L. **Dissertação**. Mestrado em Ciências Agrárias: Universidade Federal de Santa Catarina. 2001.

SMITH D.; SINGH, A.P.; WILTON, L. **Zygotic embryogenesis in *Pinus radiata in vivo and in vitro***. Resumo. 3º Meeting International conifer tissue culture work group, Rotorua, p.12-16. 1985.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (SBS). **Cultura de *Pinus* no Brasil. 2007.** Disponível em: http://www.celso-foelkel.com.br/Pinusletter/cultura_Pinus_brasil.zip. Acesso em: 27 abr 2016.

SOLÍS-RAMOS L. Y.; ANDRADE-TORRES A.; SÁENZ-CARBONELL L. A.; OROPEZA-SALÍN C. M.; CASTAÑO DE LA SERNA E. **Somatic embryogenesis in recalcitrant plants**. *In: Embryogenesis*, Ed. Sato, v.1 p.597–618. 2012.

STASOLLA, C. Glutathione redox regulation of *in vitro* embryogenesis. Elsevier: **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.319-327. 2010.

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

STCP – PROJECT ENGINEERING. Informativo: **O apagão e o Brasil florestal em 2020.** Disponível em: <http://www.stcp.com.br/upload/publicacoes/08062011143242.pdf>. 2004. Acesso em: 05 abr 2016.

STEINER, N. **Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* (Linnaeus) e *Picea abies* (Linnaeus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene *SERK***. Tese. Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais: Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC. 2009.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; ANDRADE, J.B.R.; BALBUENA, T.S.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W.; FLOH E.I.S.; SILVEIRA, V. *Araucaria angustifolia* Biotechnology. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v.2 p.20-28. 2008.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; FLOH E.I.S.; GUERRA, M.P. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* Embryogenic cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.89 p.55-62. 2007.

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

SUASSUNA, J. **A cultura do *Pinus*: uma perspectiva e uma preocupação**. **Brasil Florestal**, n.29 1977. Disponível em: <http://www.fundaj.gov.br/index.php?option=com_content&id=760&Itemid=376>. Acesso em: 23 abr. 2016.

SUPRASANNA, P.; CHOUDHARY, R.S.; DESAI, N.S.; BAPAT, V.A. Regulation of somatic embryogenesis by plant growth regulators in sugarcane. **Sugar tech**, v.7, p.123-128, 2005.

TERESO, S.; ZOGLAUER, K.; MILHINHOS, A.; MIGUEL C.; OLIVEIRA, C. C.; Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. **Tree Physiology**, v.27, p.661-669, 2007.

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

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.

YANG, X. Y.; ZHANG, X. L.; FU, L.L.; MIN, L.; LIU, G. Multiple shoots induction in wild cotton (*Gossypium bickii*) through organogenesis and the analysis of genetic homogeneity. **Biology**, v.63, p.496-503, 2010.

YILDIRIM, T.; KAYA, Z.; IŞIK, K. Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* TEM. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.87, p.67, 2006.

ZHANG, C. G.; LI, W.; MAO, Y. F.; ZHAO, D. L.; DONG, W.; GUO, G. Q. Endogenous hormonal levels in *Scutellaria baicalensis* calli induced by thidiazuron. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.52, p.345–351, 2005.

ZHANG, X.; MU, J.; CHU, D.; ZHAO, Y. Synthesis of fire retardants based on N and P and poly (sodium silicate-aluminum dihydrogen phosphate) (PSADP) and testing the flame retardant properties of PSADP impregnated poplar wood. **Holzforschung**, v.70, p.341–350, 2016.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – ANOVA dos resultados de formação de calos para efeito de diferentes meios de cultura com ou sem adição de ácido fólico (100 mg.L⁻¹) na calogênese e embriogênese somática de megagametófitos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* após 90 dias de cultura.

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Fator 1 (F1)	2	1126.66667	563.33333	5.7288 **
Fator 2 (F2)	1	4813.33333	4813.33333	48.9492 **
Int. F1xF2	2	86.66667	43.33333	0.4407 ns
Tratamentos	5	6026.66667	1205.33333	12.2576 **
Resíduo	24	2360.00000	98.33333	
Total	29	8386.66667		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

ANEXO 2 – ANOVA dos dados de formação de embriões somáticos para efeito de diferentes meios de cultura com ou sem adição de ácido fólico (100 mg.L⁻¹) na calogênese e embriogênese somática de megagametófitos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* após 90 dias de cultura.

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Fator 1 (F1)	2	166.66667	83.33333	8.3333 **
Fator 2 (F2)	1	120.00000	120.00000	12.0000 **
Int. F1xF2	2	60.00000	30.00000	3.0000 ns
Tratamentos	5	346.66667	69.33333	6.9333 **
Resíduo	24	240.00000	10.00000	
Total	29	586.66667		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

ANEXO 3 – ANOVA dos dados de formação de calos em diferentes explantes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* cultivados por 90 dias em meio QL adicionado de ácido fólico.

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	8425.00000	2808.33333	44.9333 **
Resíduo	12	750.00000	62.50000	
Total	15	9175.00000		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

ANEXO 4 – ANOVA dos resultados da taxa de oxidação em diferentes explantes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* cultivados por 90 dias em meio QL adicionado de ácido fólico.

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	3500.00000	1166.66667	23.3333 **
Resíduo	12	600.00000	50.00000	
Total	15	4100.00000		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

ANEXO 5 – ANOVA dos dados de formação de calos em efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e de BAP em meio QL adicionado de ácido fólico (100 mg.L^{-1}) na calogênese de megagametófito de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* após 90 dias de cultura.

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Fator 1 (F1)	3	5450.00000	1816.66667	40.9390 **
Fator 2 (F2)	3	6330.00000	2110.00000	47.5493 **
Int. F1xF2	9	2600.00000	288.88889	6.5102 **
Tratamentos	15	14380.00000	958.66667	21.6038 **
Resíduo	64	2840.00000	44.37500	
Total	79	17220.00000		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$).