

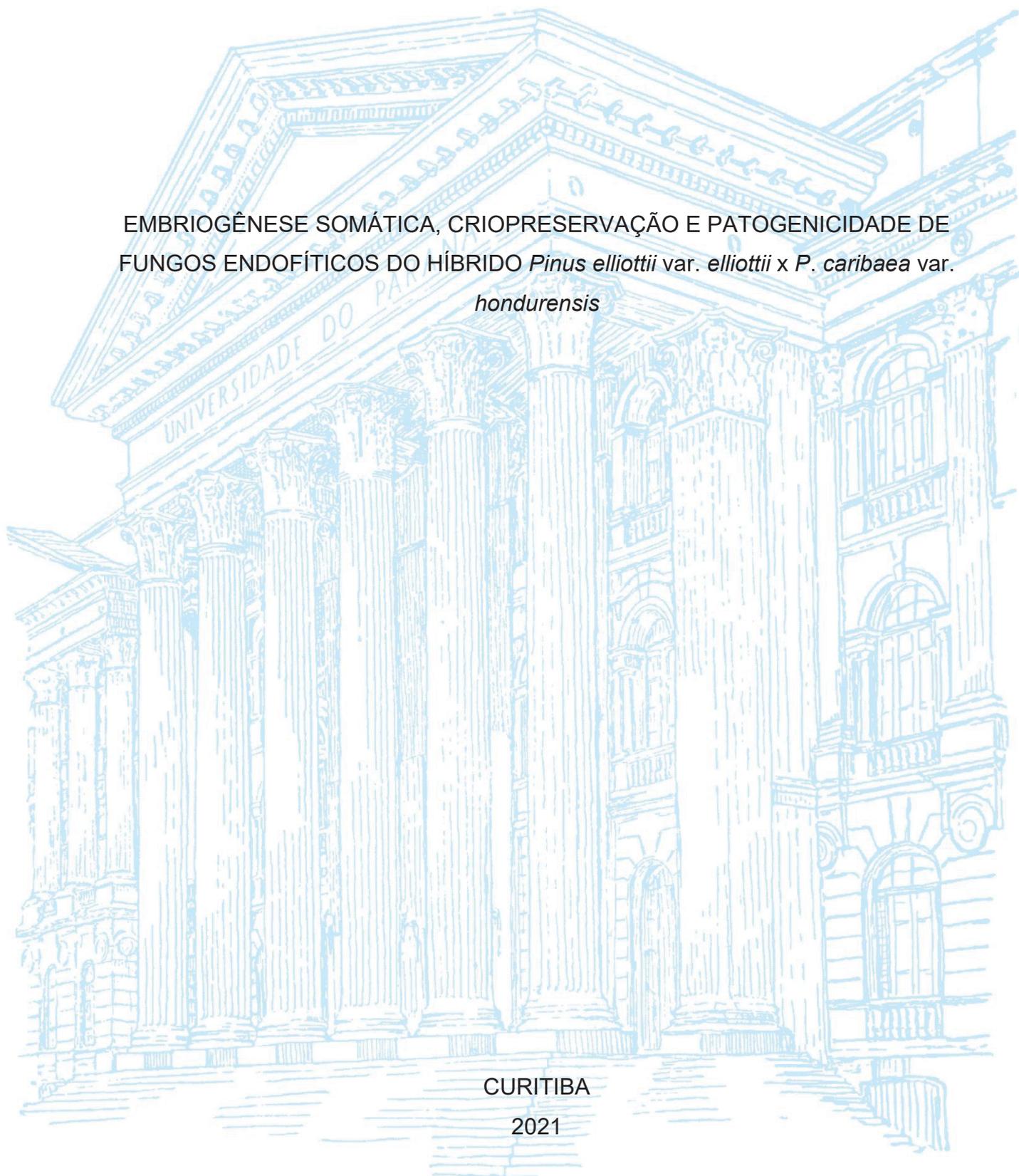
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO ARTHUR TIKLER SOUSA

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, CRIOPRESERVAÇÃO E PATOGENICIDADE DE  
FUNGOS ENDOFÍTICOS DO HÍBRIDO *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var.  
*hondurensis*

CURITIBA

2021



JOÃO ARTHUR TIKLER SOUSA

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, CRIOPRESERVAÇÃO E PATOGENICIDADE DE  
FUNGOS ENDOFÍTICOS DO HÍBRIDO *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var.  
*hondurensis*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal; Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Florestal, área de Concentração em Silvicultura.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Coorientadores: Dra. Juliana Degenhardt  
Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos  
Profa. Dra. Giovana Bomfim de Alcantara

CURITIBA

2021

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

Sousa, João Arthur Tikler

Embriogênese somática, criopreservação e patogenicidade de fungos endofíticos do híbrido *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* / João Arthur Tikler Sousa. – Curitiba, 2021.

1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Coorientadores: Dra. Juliana Degenhardt

Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Profa. Dra. Giovana Bomfim de Alcantara

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba, 13/12/2021. Área de concentração: Silvicultura.

1. Fungos. 2. Eucalipto - Doenças e pragas - Controle. 3. Fungos - Genética. 4. Fungos patogênicos. 5. Teses. I. Auer, Celso Garcia. II. Degenhardt, Juliana. III. Santos, Álvaro Figueredo dos. IV. Alcantara, Giovana Bomfim de. V. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. VI. Título.

CDD – 634.9

CDU – 634.0.443

Bibliotecária: Berenice Rodrigues Ferreira – CRB 9/1160



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA  
FLORESTAL - 40001016015P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA FLORESTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **JOÃO ARTHUR TIKLER SOUSA** intitulada: "**Embriogênese somática, criopreservação e patogenicidade de fungos endofíticos do híbrido *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis***", sob orientação do Prof. Dr. CELSO GARCIA AUER, que após terem inquirido o aluno e realizada 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, 13 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

13/12/2021 13:08:51.0

CELSO GARCIA AUER

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

15/12/2021 10:02:40.0

REGINA CAETANO QUISEN

Avaliador Externo (EMBRAPA FLORESTAS)

Assinatura Eletrônica

13/12/2021 14:58:10.0

SUELEN SANTOS REGO

Avaliador Externo (FACULDADE DE JAGUARIAIVA)

Aos meus pais, Francisco Gilberto Lopes Sousa e Iuná Tikler Sousa, e minha irmã Francine Carolina Tikler Sousa, que sempre acreditaram e me apoiaram nesta trajetória.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder o dom da vida, me guiando e me regendo sempre por belos caminhos.

Aos meus pais, Francisco e Iuná, pela minha formação, apoio, carinho, confiança e incentivo em todos os momentos.

A minha irmã, Francine, por toda a compreensão e empatia sempre que precisei.

Ao meu orientador Dr. Celso Garcia Auer e meus coorientadores: Dra. Juliana Degenhardt, Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos e Profa. Dra. Giovana Bomfim de Alcantara, os quais me ensinaram como ser alguém melhor tanto profissionalmente quanto pessoalmente.

À banca examinadora que aceitou o convite.

À Dra. Ananda Aguiar, Dra. Cristiane Helm, Dra. Dagma Kratz e Dra. Krisle da Silva por todo apoio e conhecimento compartilhado.

Ao professor Dr. Alexandre Behling, pela disponibilidade e ajuda nas análises estatísticas desse trabalho.

Aos professores e pesquisadores que de forma direta ou indireta participaram de minha formação e do desenvolvimento desse trabalho.

Ao Laboratório de Patologia Florestal, à Caroline Buhner e ao Davi, ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação, à Janaina e Mariane, e ao Laboratório de Biotecnologia Florestal, à Angela Ikeda, pela amizade, parceria e ensinamentos durante todo meu tempo nos laboratórios.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação: Alexandre, Annaliz, Dáryan, Evelyn, Fabrícia, Laudiane e Lucas; do Laboratório de Patologia Florestal: Ana Carolina, Gabriela, Lara, Roberto e Thiele e do Laboratório de Biotecnologia Florestal: Andrew e Vanessa, por todos os momentos compartilhados nessa vida acadêmica e fora dela.

À todos os meus amigos e familiares, por tornarem meus dias mais felizes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade e por me fazer um grande profissional.

Aos secretários do Programa de Pós-graduação, Reinaldo e Davi, pela disponibilidade em auxiliar em todas as questões administrativas.

À Embrapa Florestas pela oportunidade de estudos e utilização das instalações para a realização dos experimentos e ao Régis Montibeller por toda atenção e assessoria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos que participaram e contribuíram para realização deste trabalho!

*A vida sem ciência é uma espécie de morte*  
(SOCRÁTES)

## RESUMO

O híbrido *Pinus elliottii* var. *elliottii* (PEE) x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (PCH) vem se destacando pela produção de madeira e resina. Visando dar suporte ao melhoramento genético do híbrido, este trabalho teve como objetivos (I) otimizar um protocolo de clonagem baseado na embriogênese somática, (II) otimizar um protocolo de criopreservação de massas embriogênicas e (III) verificar a patogenicidade de fungos endofíticos encontrados em sementes imaturas do híbrido. Para a embriogênese somática foram analisados o efeito do genótipo na indução da embriogênese somática. Na fase de maturação, foram avaliadas diferentes composições de meio e estresses abióticos, e analisado o efeito de antibiótico na taxa de crescimento das massas embriogênicas. Na criopreservação, foram testadas duas soluções crioprotetoras, PSD e PVS3, avaliando a concentração de PSD e o tempo de exposição ao PVS3 das massas embriogênicas. Para os fungos endofíticos, foram realizados experimentos para avaliar a patogenicidade em sementes, plântulas *in vitro* e mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. A iniciação de massas embriogênicas mostrou-se dependente do genótipo, com uma taxa de indução de 5,45 %. Nos experimentos de maturação, não foi observada formação de embriões somáticos. No que diz respeito a criopreservação, os dois protocolos mostraram-se aplicáveis às massas embriogênicas do híbrido. No experimento em que massas embriogênicas foram tratadas com o crioprotetor PVS3, após 90 dias, o tempo de exposição não influenciou no crescimento das massas submetidas a criopreservação. A utilização de antibióticos no meio de proliferação, não afetou estatisticamente a taxa de crescimento das massas embriogênicas. Dentre os fungos endofíticos isolados, *Fusarium* spp. e *Diplodia pinea* foram patogênicos em sementes, plântulas *in vitro* e em mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. A espécie *Sporothrix pallida* foi relatada pela primeira vez associada ao gênero *Pinus*.

Palavras-chave: Maturação. Crioprotetor. *Fusarium*. Florestal.

## ABSTRACT

The hybrid *Pinus elliottii* var. *elliottii* (PEE) x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (PCH) is of great interest for the production of wood and resin. Aiming to support the genetic breeding program, the objectives of this work were (I) to optimize a somatic embryogenesis protocol, (II) to optimize a cryopreservation of embryogenic masses protocol and (III) to evaluate the pathogenicity of endophytic fungi isolated from immature seeds of the hybrid. For somatic embryogenesis, the effect of genotype on initiation of somatic embryogenesis was evaluated. In the maturation phase, several compositions of medium and abiotic stresses were evaluated, and the effect of antibiotics on the growth rate of embryogenic masses was also evaluated. In cryopreservation, two cryoprotectant solutions were tested, PSD and PVS3 and the concentration of PSD and the time of exposure to PVS3 of the embryogenic masses were evaluated. Regarding the endophytic fungi, we carried out experiments to evaluate the pathogenicity in seeds, in vitro seedlings and seedlings of *Pinus elliottii* var. *elliottii*. We observed that the initiation of embryogenic masses was genotype dependent, with an initiation rate of 5.45%. Regarding the maturation experiments, the development of somatic embryos was not observed. In the cryopreservation experiments, both protocols proved to be applicable to the embryogenic masses of the hybrid. In the experiment in which embryogenic masses were treated with the cryoprotectant PVS3, after 90 days, the exposure time did not influence the growth of the masses submitted to cryopreservation. The use of antibiotics in the proliferation medium did not affect the growth rate of embryogenic masses. Among the isolated endophytic fungi, *Fusarium* spp. and *Diplodia pinea* were pathogenic for seeds, in vitro seedlings and seedlings of *Pinus elliottii* var. *elliottii*. The species *Sporothrix pallida* was reported for the first time associated with the genus *Pinus*.

Keywords: Maturation. Cryoprotectant. *Fusarium*. Forest.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Etapas da embriogênese somática em gimnospermas ( <i>Pinaceae</i> ). ....	23
FIGURA 2 – Processo de extração do megagametófito desde o cone imaturo de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> x <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i> , Embrapa (Colombo-PR).....	36
FIGURA 3 – Extrusão e formação da massa embriogênica de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii</i> x <i>P. caribaea</i> var <i>hondurensis</i> . Colombo - PR .....	47
FIGURA 4 – Massa embriogênica de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii</i> x <i>P. caribaea</i> var <i>hondurensis</i> e coloração de carmim acético e azul de Evans. Colombo – PR. ....	49
FIGURA 5 – Colorações histoquímicas em células embriogênicas de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> x <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i> , para polissacarídeos, amido, proteínas e lipídios. Colombo – PR.....	52
FIGURA 6 – Identificação morfológica de <i>Diplodia pinea</i> . Colombo – PR. ....	75
FIGURA 7 – Ensaio de patogenicidade com <i>Fusarium</i> sp. proveniente de embriões imaturos de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> x <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i> em plântulas de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii in vitro</i> . Colombo – PR. ....	77
FIGURA 8 – Ensaio de patogenicidade com o <i>Fusarium</i> sp. proveniente de embriões imaturos de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> x <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i> em sementes de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii</i> . Colombo – PR.....	79
FIGURA 9 – Ensaio da patogenicidade de <i>Diplodia pinea</i> proveniente de embriões imaturos de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> x <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i> em mudas de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii</i> . Colombo – PR. ....	81

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Relação das matrizes coletadas por ano e o total de megagametófitos imaturos inoculados de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> x <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i> , Embrapa (Colombo-PR).....	37
TABELA 2 – Croqui do experimento de dessecação parcial de massas embriogênicas de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii</i> x <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> relacionando o tempo de exposição a câmara de fluxo laminar e a linhagem testada. Embrapa (Colombo-PR).....	40
TABELA 3 – Taxa de indução da embriogênese somática em relação a genótipos responsivos de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii</i> x <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> nos anos de 2019 e 2021. Colombo – PR. ....	48
TABELA 4 – Efeito da concentração de PSD, da lavagem do crioprotetor e da criopreservação na taxa de crescimento das massas embriogênicas de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> x <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i> aos 30 dias. Colombo – PR.....	54
TABELA 5 – Efeito da concentração do crioprotetor PSD e da criopreservação na taxa de crescimento das massas embriogênicas de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> x <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i> aos 30 dias. Colombo – PR. ....	55
TABELA 6 – Efeito de diferentes tempos de exposição ao crioprotetor PVS3 e da criopreservação de massas embriogênicas de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> x <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i> aos 30 e 90 dias. Colombo – PR. ....	57
TABELA 7 – Efeito do uso de antibiótico no meio de cultura e sua influência na taxa de crescimento das massas embriogênicas e como controle de contaminação.....	59
TABELA 8 – Percentual de compatibilidade molecular dos isolados de fungos provenientes de embriões imaturos de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> x <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i> . Colombo – PR.....	74
TABELA 9 – Percentual de plântulas de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii</i> com sintomas <i>in vitro</i> . Colombo – PR.....	76
TABELA 10 – Patogenicidade em plântulas, sementes e mudas de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii</i> . Colombo – PR.....	76

TABELA 11 – Percentual de emergência de plântulas de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> “Sem sintomas”, “Com sintomas” e “Sementes não germinadas”, aos 60 dias após a inoculação das sementes com os isolados. Colombo – PR. ..78	
TABELA 12 – Percentual de mudas de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> com sintomas, aos 21 dias após a inoculação dos 2 isolados de <i>Diplodia pinea</i> e a média do tamanho da lesão. Colombo – PR. ....80	

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

2,4 – D	- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AA	- Meio de cultura de Ágar-Água
AAA	- Meio de cultura de ágar-água-acícula de pínus de De Wet et al. (2003)
ABA	- Ácido Abscísico
BAP	- Benzilaminopurina
BDA	- Meio de cultura de Batata-Dextrose-Ágar
BOD	- <i>Biochemical Oxygen Demand</i> (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ES	- Embriogênese somática
IBÁ	- Indústria Brasileira de Árvores
mLV	- Meio de cultura de Litvay et al. (1985)
PCH	- <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PEE	- <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i>
PEG	- Polietilenoglicol
RNA	- Ácido Ribonucleico
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

## LISTA DE SÍMBOLOS

° - graus

°C – grau Celsius

% - porcentagem

® - marca registrada

™ - *trade mark*, marca comercial

v/v - (volume de soluto) / (volume de solução)

g L<sup>-1</sup> - gramas por litro

mg L<sup>-1</sup> - miligramas por litro

mM - milimolar

μM - micromolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>16</b>
1.1	OBJETIVOS .....	17
1.1.1	Objetivo geral .....	17
1.1.2	Objetivos específicos.....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
2.1	<i>PINUS ELLIOTTII</i> VAR. <i>ELLIOTTII</i> X <i>PINUS CARIBAEA</i> VAR. <i>HONDURENSIS</i> .....	19
2.2	MELHORAMENTO FLORESTAL DO HÍBRIDO PEE X PCH.....	20
2.3	EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	22
<b>2.3.1</b>	<b>Etapas da Embriogênese somática em coníferas</b> .....	<b>23</b>
2.4	CRIOPRESERVAÇÃO .....	26
2.5	FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	28
	<b>CAPÍTULO 1 – EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E CRIOPRESERVAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS DO HÍBRIDO <i>PINUS ELLIOTTII</i> VAR. <i>ELLIOTTII</i> X <i>P. CARIBAEA</i> VAR. <i>HONDURENSIS</i>.</b> .....	<b>30</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
2.1	LOCAL DE PESQUISA.....	35
2.2	MATERIAL VEGETAL .....	35
2.3	INDUÇÃO E PROLIFERAÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA .....	36
<b>2.3.1</b>	<b>Efeito do genótipo na indução da embriogênese somática</b> .....	<b>36</b>
2.4	ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS .....	38
2.5	MATURAÇÃO.....	38
<b>2.5.1</b>	<b>Efeito do pulso térmico sobre a maturação</b> .....	<b>38</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Efeito da dessecação parcial do tecido embriogênico sobre a maturação</b> .....	<b>39</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Efeito do carvão ativado, Gelrite™ e da sacarose sobre a maturação</b> ..	<b>40</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Efeito do polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) sobre a maturação das massas embriogênicas</b> .....	<b>40</b>
2.5.5	Efeito dos carboidratos, sacarose e maltose sobre a maturação .....	41
2.5.6	Efeito da concentração de ABA na maturação do tecido embriogênico .....	41

2.5.7	Efeito do meio de cultura na maturação do tecido embriogênico .....	41
2.6	PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	42
2.7	AVALIAÇÕES DOS EXPERIMENTOS DE MATURAÇÃO .....	42
2.8	TESTES HISTOQUÍMICOS.....	42
2.9	CRIOPRESERVAÇÃO .....	43
2.9.1	Efeito da concentração da solução crioprotetora PSD (20% PEG 4000, 20% Sacarose e 20% DMSO), lavagem do crioprotetor do tecido embriogênico e da criopreservação.....	43
2.9.2	Efeito do tempo do tecido embriogênico na presença do crioprotetor PVS3 (40% de glicerol + 40% de sacarose, em meio mLV) e da criopreservação no tecido embriogênico.....	44
2.10	EFEITO DA AÇÃO DO CLAVULIN® E DO PPM™ NO CRESCIMENTO DO TECIDO EMBRIOGÊNICO.....	45
2.11	AVALIAÇÕES.....	45
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
3.1	EFEITO DO GENÓTIPO NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	47
3.2	ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS.....	49
3.3	MATURAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS.....	49
3.4	TESTES HISTOQUÍMICOS.....	51
3.5	CRIOPRESERVAÇÃO .....	54
3.5.1	Efeito da concentração da solução crioprotetora a 5 e 7,5% de PSD (20% PEG 4000; 20% Sacarose e 20% DMSO), lavagem do crioprotetor do tecido embriogênico e criopreservação.....	54
3.5.2	Efeito do tempo do tecido embriogênico na presença do crioprotetor PVS3 (glicerol 40% (v/v) e sacarose 40% (v/v)) e criopreservação do tecido embriogênico.....	57
3.6	EFEITO DA AÇÃO DO CLAVULIN® E DO PPM™ NO CRESCIMENTO DO TECIDO EMBRIOGÊNICO.....	59
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 2 – PATOGENICIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM SEMENTES IMATURAS DO HÍBRIDO <i>PINUS ELLIOTTII</i> VAR. <i>ELLIOTTII</i> X <i>P. CARIBAEA</i> VAR. <i>HONDURENSIS</i> EM SEMENTES, PLÂNTULAS E MUDAS.....</b>		
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>

2.1	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS .....	66
2.1.1	Obtenção das culturas monospóricas.....	66
2.1.2	Identificação morfológica e molecular dos isolados.....	67
2.2	SEMENTES E MUDAS PARA OS TESTES DE PATOGENICIDADE .....	69
2.3	TESTE DE PATOGENICIDADE EM PLÂNTULAS <i>IN VITRO</i> .....	69
2.3.1	Montagem do Experimento.....	69
2.3.2	Reisolamento.....	70
2.4	TESTE DE PATOGENICIDADE EM SEMENTES DE <i>PINUS ELLIOTTII</i> VAR. <i>ELLIOTTII</i> .....	70
2.4.1	Avaliação .....	71
2.5	TESTE DE PATOGENICIDADE EM MUDAS DE <i>PINUS ELLIOTTII</i> VAR. <i>ELLIOTTII</i> .....	71
2.5.1	Avaliação .....	72
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	73
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>74</b>
3.1	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS ISOLADOS.....	74
3.2	TESTE DE PATOGENICIDADE EM PLÂNTULAS DE <i>PINUS ELLIOTTII</i> VAR. <i>ELLIOTTII IN VITRO</i> .....	75
3.3	TESTE DE PATOGENICIDADE EM SEMENTES DE <i>PINUS ELLIOTTII</i> VAR. <i>ELLIOTTII</i> .....	78
3.4	TESTE DE PATOGENICIDADE EM MUDAS DE <i>PINUS ELLIOTTII</i> VAR. <i>ELLIOTTII</i> .....	80
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
4.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS .....	83
4.2	TESTE DE PATOGENICIDADE EM PLÂNTULAS DE <i>PINUS ELLIOTTII</i> VAR. <i>ELLIOTTII</i> .....	83
4.3	TESTE DE PATOGENICIDADE EM SEMENTES DE <i>PINUS ELLIOTTII</i> VAR. <i>ELLIOTTII</i> .....	84
4.4	TESTE DE PATOGENICIDADE EM MUDAS DE <i>PINUS ELLIOTTII</i> VAR. <i>ELLIOTTII</i> .....	85
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
	RECOMENDAÇÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	86
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O setor florestal brasileiro está em constante expansão, desenvolvendo novas tecnologias, produtos e processos. Em 2019, sua participação foi de 1,2% do PIB nacional. Atualmente a área plantada no Brasil é de 9 milhões de hectares, que vem aumentando ano após ano. Para as florestas plantadas, dois gêneros são destaque no país, o *Eucalyptus* e o *Pinus*, com 6,97 e 1,64 milhões de hectares plantados, respectivamente. No estado do Paraná, o pínus abrange a maior porcentagem das áreas plantadas, com 0,72 milhão de hectares (IBÁ, 2020). Este gênero apresenta várias finalidades de uso, como madeira para laminação, polpa para papel e celulose e resinas (SHIMIZU, 2008).

O híbrido *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* vem se destacando na qualidade e na produtividade de resina (PANG et al., 2009). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de resina de pínus ficando atrás apenas da China (IBGE, 2019). Entre as safras de 2016 a 2018, a produção de goma de resina somou mais de 350 mil toneladas (ARESB, 2021), gerando mais de 15 mil empregos diretos, o que confere a produção ainda mais destaque no país (DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA, 2017). O híbrido estudado neste trabalho, está presente no programa de melhoramento de *Pinus* da Embrapa Florestas, para seleção de melhores genótipos para resinagem e para madeira (AGUIAR, 2011).

Apesar da seleção de materiais de maior produtividade, o plantio de clones ainda não é considerável e um dos principais gargalos é a falta de protocolos de propagação vegetativa eficientes. A estaquia, principal técnica de macropropagação utilizada para a maioria das espécies, apresenta limitações, como a dificuldade de enraizamento. Uma alternativa para a multiplicação clonal em larga escala desse material que vem demonstrando ser promissora para as espécies de coníferas é a embriogênese somática (DEGENHARDT-GOLDBACH, 2014). A técnica pode ser definida como o processo pelo qual células somáticas passam por diferentes estágios embriogênicos, originando embriões sem que ocorra a fusão de gametas (PINHAL et al., 2011). No entanto, para a maioria das espécies protocolos eficientes ainda não estão disponíveis ou são incipientes e devem ser otimizados para que possam ser utilizados em escala comercial.

O material clonado por embriogênese somática é multiplicado *in vitro* e tem o potencial de gerar milhares de embriões em pouco espaço e, quando a técnica é estabelecida, em pouco tempo. No entanto, devido à perda de potencial embriogênico ao longo dos subcultivos *in vitro*, é interessante para evitar perdas de material genético, a conservação desse material em laboratório por meio da criopreservação. Essa técnica consiste em armazenar o material de interesse em temperaturas ultrabaixas, em nitrogênio líquido (-196° C), na qual ocorre a interrupção dos processos metabólicos e de divisão celular (ENGELMANN, 2004). A criopreservação permite que o material seja conservado e armazenado por longos períodos, sendo considerada uma das técnicas mais viáveis de conservação *ex situ*. Alguns protocolos estão disponíveis para o gênero *Pinus*, no entanto, os resultados demonstram a necessidade de otimizações que possibilitem uma maior eficiência para cada genótipo.

Durante o cultivo *in vitro* é comum ocorrerem perdas significativas devido à contaminação por microrganismos presentes na superfície dos explantes ou por microrganismos endofíticos, principalmente fungos e bactérias. Este trabalho foi desenvolvido visando dar suporte à produção massal *in vitro* de material clonal de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*, por meio da embriogênese somática, sua conservação *ex situ*, utilizando a técnica de criopreservação e da identificação e avaliação da patogenicidade de fungos isolados no desenvolvimento desse trabalho.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos:

Capítulo 1 – Embriogênese somática e criopreservação de massas embriogênicas do híbrido *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*.

Capítulo 2 – Identificação de fungos endofíticos em sementes imaturas do híbrido *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* e patogenicidade.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Esse trabalho objetivou desenvolver um protocolo de embriogênese somática e de criopreservação de massas embriogênicas e avaliar a patogenicidade de fungos

endofíticos isolados de sementes imaturas de *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do genótipo na indução da embriogênese somática de *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*.

- Avaliar o efeito da temperatura, da dessecação parcial, do carvão ativado, do Gelrite™, da sacarose, da maltose, do polietilenoglicol 4000 (PEG 4000), do ácido abscísico (ABA) na maturação da embriogênese somática de *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*.

- Analisar a presença de açúcares, proteínas e lipídios nas massas embriogênicas de *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* mediante análises histoquímicas.

- Avaliar o efeito da concentração da solução crioprotetora PSD (PEG 4000 + Sacarose + DMSO) e do tempo de exposição da solução crioprotetora PVS3 (Plant vitrification solution nº 3) na criopreservação de massas embriogênicas de *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*.

- Avaliar o efeito de antibióticos no crescimento de massas embriogênicas de *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*.

- Avaliar a patogenicidade dos fungos endofíticos isolados de *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* em sementes, plântulas e mudas de *Pinus elliotii* var. *elliotii*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*

Segundo o *Catalogue of Life* (2021) existem atualmente 185 espécies de *Pinus*, incluindo as variedades. Além das espécies, há também os híbridos que são obtidos de cruzamentos interespécies, com a finalidade de desenvolver indivíduos mais produtivos, com maior taxa de crescimento e com melhores características de madeira (NIKLES, 2000).

Em 2019, a área plantada com pínus no Brasil era de 1,64 milhões de hectares e destes, 44% eram plantios no estado do Paraná, com 720 mil hectares, seguido por Santa Catarina com 26% de áreas plantadas, 430 mil hectares (IBÁ, 2020).

O pínus apresenta diversas aplicações comerciais, como a utilização da madeira, produção de celulose e extração de resina (SANTOS et al., 2016). Um exemplo dessa versatilidade do pínus é o híbrido obtido do cruzamento de *Pinus elliottii* var. *elliottii* (PEE) x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (PCH), estudado nesse trabalho, essa hibridação foi inicialmente descrita em 1955, na Austrália (NIKLES, 2000).

O PEE e o PCH possuem características complementares. O PEE possui tronco reto, é resistente ao vento, ao frio e com melhor adaptabilidade aos locais úmidos que o PCH. Já o PCH possui crescimento mais acelerado, apresenta fuste com poucas ramificações e sua madeira é mais uniforme (NIKLES, 2000).

Em um trabalho realizado em Queensland, na Austrália comparando plantios de PEE, PCH e do híbrido em gerações de F1 e F2, com 15 anos de idade, os autores estimaram um Incremento Médio Anual (IMA) de 17,6; 23,0; 23,7 e 23,5 m<sup>3</sup>/ha/ano para PEE, PCH, F1 e F2, respectivamente (DIETERS, BROWNER, 2007). Na Argentina, na região da Mesopotâmia na comparação do desenvolvimento dos plantios de PEE, *P. taeda* e do híbrido (PEE x PCH) em gerações de F1 e F2, aos 10 anos de idade, foi observada superioridade de F1 do híbrido em relação às espécies puras. Os autores observaram DAP de 24,1 e 21,9 cm e altura de 15,8 e 15,5 m, respectivamente para as gerações F1 e F2 do híbrido, e DAP de 23,5 e 19,6 cm, e altura de 15,4 e 12,9 m, respectivamente para *P. taeda* e *P. elliottii* (CAPPA et al., 2012).

No Brasil, o híbrido foi implantado no estado de São Paulo, na cidade de Buri, pela empresa Pínus Brasil, no ano 2000. Estudos da empresa revelaram em 2009, em um plantio de 5,6 anos, que o desenvolvimento do híbrido em relação ao plantio de espécies puras como o de *P. elliotii* e *P. taeda*, apresentou incremento médio anual (IMA) de 44,8 m<sup>3</sup>/ha/ano. *P. elliotii* obteve IMA de 18,8 m<sup>3</sup>/ha/ano, e o *P. taeda*, IMA de 28,5 m<sup>3</sup>/ha/ano, o que reforça a viabilidade de investimento no híbrido. De acordo com a empresa, o híbrido apresenta ainda como vantagem a redução de dez anos em seu ciclo entre a implantação e o corte final. A alta precocidade e a maior produtividade por hectare, a diminuição dos custos operacionais e, conseqüentemente, o retorno mais rápido do investimento, fazem de seu cultivo um potencial gerador de recursos e investimentos na região sudoeste de São Paulo (PINUS BRASIL, 2014).

## 2.2 MELHORAMENTO FLORESTAL DO HÍBRIDO PEE x PCH

O melhoramento genético é a aplicação de técnicas de seleção e recombinação, com vistas ao aumento da frequência dos alelos favoráveis das características de interesse em uma população (PIRES et al., 2011) que possam resultar no aumento da produtividade, adequação da matéria prima ao produto final, melhorias nas condições adaptativas, tais como resistência a pragas e doenças, e principalmente a manutenção da variabilidade genética (PIGATO; LOPES, 2001). Os principais obstáculos na prática do melhoramento genético de espécies florestais são o tempo necessário para completar um ciclo de seleção e recombinação de indivíduos para características quantitativas e que se expressam somente em idades mais avançadas (QUOIRIN; VIEIRA, 1995). O estabelecimento de estratégias eficientes de melhoramento depende essencialmente do prévio conhecimento dos mecanismos genéticos responsáveis pela herança do caráter que se deseja melhorar (RESENDE, 2002).

A Embrapa Florestas possui um programa de melhoramento de *Pinus* que visa a obtenção de genótipos superiores para múltiplos usos e em diferentes condições edafoclimáticas, o desenvolvimento de híbridos interespecíficos e a seleção dos genótipos que sejam resistentes a fatores bióticos e abióticos, além de desenvolver tecnologias para a propagação vegetativa massal (AGUIAR et al, 2011).

Os híbridos interespecíficos têm grande importância nos programas de melhoramento genético quando diferentes caracteres de interesse estão presentes em espécies distintas (ASSIS; MAFIA, 2007). O PEE x PCH apresenta alto incremento

volumétrico do *P. caribaea* var. *hondurensis*, e a qualidade física e mecânica da madeira próximas à do *P. elliottii* (SHIMIZU et al., 2008).

Visando a expansão da base florestal com madeira de *Pinus* spp., tem-se investido no estudo e introdução de novas espécies deste gênero e no avanço em programas de melhoramento genético. Como exemplo destes esforços em meados de 2000 foram implantados talhões experimentais com híbridos interespecíficos de PEE x PCH F2 de alto potencial sob o ponto de vista silvicultural no que diz respeito à produção de madeira no estado de São Paulo (ALMEIDA et al., 2012).

Os plantios com PEE x PCH vêm destacando-se pela sua forma de fuste e maior produtividade em biomassa em relação ao seus parentais (DIETERS; BRAUNER, 2007), além da qualidade e produtividade de sua resina (PANG et al., 2009). O híbrido apresentou maior produtividade em resina quando comparado ao *P. elliottii*, *P. caribaea* e *P. massoniana*, não apresentando diferenças significativas entre a composição química de sua resina (PANG et al., 2009). A precocidade de colheita do híbrido também é promissora, apresentando uma redução de 10 anos em seu ciclo, entre implantação e o corte final (ALMEIDA, 2012).

Devido a características favoráveis, a demanda por mudas desse híbrido tem aumentado, principalmente em regiões que tradicionalmente realizavam plantio de *P. elliottii* (NUNES et al., 2018). Todavia, a produção de mudas é dificultada em decorrência da limitada fonte de sementes, associado ao fato de apresentar elevada heterogeneidade, fatores que contribuem para um maior interesse em sua propagação vegetativa (LV; HUANG, 2012). A produção de mudas propagadas vegetativamente garante a qualidade genética e características de interesse que permitem ganhos em produtividade, além de uma maior resistência a fatores bióticos e abióticos, por ser um material selecionado (ASSIS; MAFIA, 2007).

Ao propagar vegetativamente o PEE x PCH utilizando estacas, estas quando submetidas ao tratamento de uma mistura de terebintina, 2.000 mg L<sup>-1</sup> paclobutrazol e Fertimaxi 2000<sup>®</sup> apresentaram até 32% de enraizamento (ANTONELLI, 2013). Estacas de *P. taeda*, apresentaram 75,9% de enraizamento (SANTOS, 2014).

Quando realizada a micropropagação *in vitro* do híbrido, este apresentou 31,3% de enraizamento em meio de cultura ½ WV5 suplementado com 0,27 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 20,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose (MENEGETTI, 2020). Para *P. tecunumanii* foi relatado enraizamento em 14,8% dos explantes *in vitro* em meio WV5 (ZANELLA et al, 2018).

Estes trabalhos de propagação do híbrido destacam as baixas taxas de enraizamento, levando a necessidade de novos estudos que venham a aumentar estas taxas, bem como a multiplicação do material em maior escala.

Para o gênero *Pinus*, em geral, há uma baixa taxa de enraizamento por mini ou microestaquia. A embriogênese somática (ES) vem se mostrando uma técnica viável de clonagem de *Pinus* que tem capacidade de formar uma planta completa e ser propagada em grande escala.

### 2.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática é uma técnica de cultura de tecidos para propagação vegetativa. O termo "somático" refere-se ao fato do embrião desenvolver-se assexuadamente de tecido vegetativo (somático) e não como resultado de fertilização. A embriogênese somática pode ser descrita como o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de uma sequência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas

Nesta técnica, células de diferentes estádios de diferenciação podem ser induzidas através de estímulos, para adquirirem novas competências morfogenéticas. Durante o seu desenvolvimento, embriões somáticos passam por estádios similares àqueles observados na embriogênese zigótica.

O emprego da embriogênese somática pode ter diferentes objetivos, que vão desde a obtenção de um modelo de referência para estudos básicos em biologia celular e molecular, fisiologia e bioquímica, até a propagação clonal, visando à conservação e o melhoramento genético das espécies (FLOH et al., 2015). O maior interesse pela embriogênese somática é a possibilidade da aplicação na propagação de culturas comerciais (VON ARNOLD et al., 2002).

O tipo de explante e o seu estágio de desenvolvimento são, provavelmente, os fatores mais importantes na determinação da capacidade embriogênica de uma cultura (GAJ, 2004). A rota de desenvolvimento dos embriões somáticos que pode ocorrer por duas vias: a primeira denominada de embriogênese direta, em que embriões somáticos se originam dos tecidos-matrizes, sem a formação de calos. E a segunda, a embriogênese indireta, em que os embriões se desenvolvem a partir de um calo, ou massa embriogênica, apresentando diferentes estádios de diferenciação

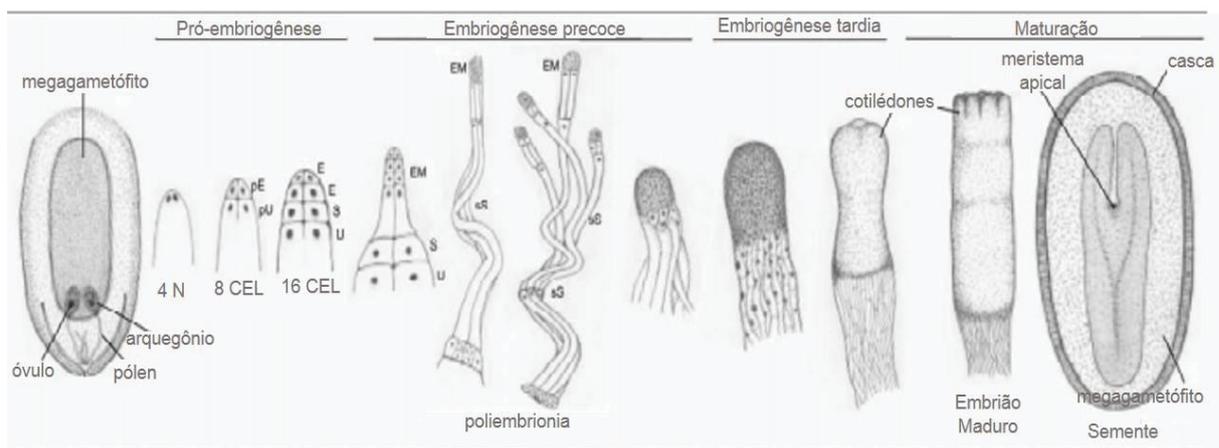
e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, os quais podem adquirir novas competências e originar embriões somáticos (SHARP et al., 1980; YEUN G, 1995). O primeiro relato de embriogênese somática é de 1958 por Steward et al. (1958) no qual os autores conseguiram regenerar plantas inteiras de cenoura via embriões somáticos.

Em gimnospermas, a técnica foi primeiramente relatada por Norstog e Rhamstine (1967) utilizando embriões zigóticos de *Zamia* spp. Em coníferas, os primeiros relatos de embriogênese somática foram em *Picea abies* (CHALUPA, 1985; HAKMAN; von ARNOLD, 1985; HAKMAN et al., 1985) e *Larix decidua* (NAGMANI; BONGA, 1985). Para o gênero *Pinus*, o primeiro relato de embriogênese somática, foi para o *P. radiata* (SMITH et al., 1985). Já para o PEE x PCH, o primeiro relato foi em 2017, por Nunes et al. (2017).

### 2.3.1 Etapas da Embriogênese somática em coníferas

A embriogênese somática em coníferas pode ser dividida em quatro etapas, sendo elas: indução, proliferação (multiplicação), maturação e conversão dos embriões em plântulas.

FIGURA 1 – Etapas da embriogênese somática em gimnospermas (*Pinaceae*).



FONTE: von Arnold et al., 2002

LEGENDA: pU – nível primário, pE - nível da embriogênese primária, E – células embriogênicas, S – células do suspensor, EM – culturas embriogênicas, sS – suspensor secundário.

I) Indução: essa etapa é caracterizada pela introdução do explante no meio de cultura, onde ocorre a reorganização do estado celular (fisiológico, metabólico e de

expressão gênica) (FEHÉR et al., 2002). Nesta fase a auxina é o regulador de crescimento mais importante para a regulação da embriogênese somática (COOKE et al, 1993), juntamente com a citocinina, que atua na divisão celular, necessária para a indução (FEHÉR et al., 2003). 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.

II) Proliferação: é a etapa onde se realiza subcultivos, visando o aumento da quantidade de tecido embriogênico, para que se possa seguir para a próxima etapa, de maturação. Nessa fase, geralmente se mantém a composição de sais do meio, podendo aumentar a concentração de citocininas no meio e a adição de caseína, pois estes estimulam a divisão celular (JIMÉNEZ, 2005).

III) Maturação: após os subcultivos, a massa embriogênica é estimulada para o desenvolvimento dos embriões somáticos. Esse estímulo pode ser por meio de temperatura, desidratação, da concentração de reguladores de crescimento, de fatores osmóticos, da fonte de carbono orgânico, entre outros agentes que promovam um estresse no tecido.

O uso de pulsos térmicos para indução de embriões somáticos em *P. radiata* e *P. halepensis*, estimulou a formação de embriões quando as massas embriogênicas foram expostas a 40 e 60° C por 30 e 5 min, respectivamente (NASCIMENTO et al, 2020).

Quando massas embriogênicas de *P. pinea*, foram expostas em câmara de fluxo laminar, por quatro diferentes tempos (2, 4, 6 e 24 h) para a dessecação parcial, observou-se o aumento do número de embriões somáticos (CARNEROS, TORIBIO, CLESTINO, 2017).

O regulador vegetal mais utilizado na maturação de espécies de *Pinus* é o ácido abscísico (ABA) embora os resultados sejam divergentes entre as espécies (PRAKASH; GURUMURTHI, 2010). Na maturação de *P. koraiensis* e *P. pinea*, quando foram avaliadas diferentes concentrações de ABA não foram observadas diferenças significativas (CARNEROS, TORIBIO, CLESTINO, 2017; PENG et al, 2021). No entanto, na maturação de PEE x PCH utilizando as concentrações de 40, 80 e 120 µM de ABA, foi observado a formação de embriões (NUNES et al, 2017).

O aumento da concentração do agente gelificante no meio de cultura, como agente osmótico vem sendo estudado para a formação de embriões. Ao utilizar

Gelrite® nas concentrações de 4, 6, 8, 10, 12 e 14 g L<sup>-1</sup>, não foi observado efeito significativo de maneira geral, mas quando analisado por linhagens as concentrações de 6 e de 12 g L<sup>-1</sup> foram significativas para duas linhagens de *P. koraiensis* respectivamente (PENG et al, 2021). Em *P. radiata*, quando foram avaliadas as concentrações de 8, 9 e 10 g L<sup>-1</sup> de Gelrite®, em 10 g L<sup>-1</sup>, houve um aumento expressivo na formação de embriões somáticos (MONCALEÁN et al, 2018).

O uso do Polietileno glicol (PEG) como agente osmótico é o mais utilizado na embriogênese somática devido ao seu caráter não plasmolisante (STASOLLA; YEUNG, 2003). Em coníferas, o PEG 4000 é considerado o peso molecular mais benéfico para a indução de embriogênese somática (BOZHKOVA, von ARNOLD, 1998; KRAJŇÁKOVÁ et al., 2013; PULLMAN, BUCALO, 2014; MERKLE et al., 2014)

Em um estudo com duas linhagens de *Picea abies* e uma de *P. omorika*, quando foi avaliado o efeito de PEG 4000, nas concentrações de 0, 5 e 7,5%, não foi observada diferença no número de embriões, nem na conversão (HAZUBSKA-PRZYBYT, WAWRZYŃIAK, 2017). Em *Pinus armandii var. amamiana*, a utilização de 100 g L<sup>-1</sup> de PEG 4000, aumentaram os números de embriões somáticos, enquanto na concentração de 150 g L<sup>-1</sup> foi observado um decréscimo (MARUYAMA, HOSOI, ISHII, 2007).

O uso de açúcares no meio de cultura, não apresenta apenas a função de fonte de carbono orgânico para o explante, mas também tem a função de causar estresse osmótico. A concentração e o tipo de açúcares influenciam a produção de embriões somáticos. Em *P. taeda* (BECWAR; PULLMAN, 1995) e *P. densiflora* (SHOJI et al. 2006) o uso de maltose apresentou efeito superior na formação de embriões.

Em coníferas, durante a etapa de maturação, os embriões somáticos passam por três fases, globular, pré-cotiledonar e pós-cotiledonar, assim como em embriões zigóticos (YANG; ZHANG, 2010). Nessa fase observa-se também o acúmulo de reservas para que o embrião possa seguir para a próxima etapa, a de conversão do embrião.

Em comparação com os embriões zigóticos, os embriões somáticos maduros podem exigir maiores reservas de armazenamento devido à ausência do megagametófito (MISRA, GREEN 1990). As reservas de armazenamento podem auxiliar o embrião a tolerar a dessecação (ATTREE et al. 1995) e a germinar vigorosamente (KONG et al. 1999). Em *Picea glauca*, foi demonstrado que embriões

somáticos maduros apresentam menores quantidades de proteínas de armazenamento e maiores concentrações de amido do que embriões zigóticos (JOY et al. 1991), enquanto embriões somáticos de *Pinus strobus* têm quantidades semelhantes ou menores de proteína de armazenamento do que embriões zigóticos (KLIMASZEWSKA et al. 2004).

IV) Conversão dos embriões: e nesta última etapa, ocorre a transformação dos embriões em plântulas, passando pelas fases normais de um embrião zigótico, a germinação, emissão da radícula e emissão da parte aérea, tendo a formação de uma planta completa (REDENBAUGH et al., 1988). Essa etapa é importante, pois apenas se a planta conseguir se estabelecer é que o protocolo de embriogênese somática está completo.

Algumas desvantagens se fazem presente no uso da embriogênese somática, como, ela apresentar genótipo-dependência, a rápida perda do potencial embriogênico após poucos meses de subcultivo e a baixa taxa de embriões somáticos formados durante a maturação, devido as diversas condições impostas nessa etapa, são alguns fatores que limitam o uso dessa prática (SANTA-CATARINA et al., 2013).

## 2.4 CRIOPRESERVAÇÃO

Para conservação de material vegetal há dois métodos, a conservação *in situ* e a *ex situ*. *In situ* conserva o material vegetal em seu ambiente natural, onde conserva também outros organismos que fazem parte de suas associações, mas esse método pode sofrer perdas por fatores ambientais ou por ação humana (PAIVA, 1994). A conservação *ex situ*, conserva o material genético fora do seu ambiente, como em câmaras de conservação de sementes, cultura de tecidos, e bancos de germoplasma (JARAMILLO; BAENA, 2002).

Um dos métodos de preservação é via meio de cultura e/ou criopreservação (CARVALHO et al, 2006). A via meio de cultura consiste em manter o material *in vitro*, a baixas temperaturas, restringindo o crescimento, aumentando o espaço entre os subcultivos e diminuindo riscos de alteração genética (variação somaclonal) (ENGELMANN, 1991).

Atualmente, a criopreservação é uma das técnicas mais pesquisadas e utilizadas como estratégia na conservação de germoplasma (SOUZA et al., 2009). Esta técnica consiste em manter o material vegetal em temperaturas ultrabaixas, em

nitrogênio líquido (-196 °C) que é capaz de interromper o metabolismo celular mantendo a sua integridade genética (CARVALHO; VIDAL, 2003), desta forma, a criopreservação não promove mudanças genéticas significativas (ASHWOOD-SMITH, 1985). A criopreservação apresenta vantagens por requerer um espaço pequeno para a instalação de um banco de germoplasma (ALMEIDA et al., 2002; ENGELMANN, 2011).

Para a criopreservação de plantas é necessária a utilização de soluções que promovam a sua desidratação antes do congelamento, pois, dessa forma, evita-se a cristalização do material intracelular e posterior rompimento das membranas celulares durante o processo de descongelamento (SANTOS, 2000).

Essas soluções, chamadas de crioprotetores, são fundamentais para sobrevivência do material vegetal durante o processo de criopreservação, pois atuam na célula diminuindo a temperatura de congelamento, reduzindo a formação de cristais de gelo, evitando o rompimento da membrana celular e sua posterior morte celular (SANTOS, 2001). Os crioprotetores mais eficientes e mais utilizados em protocolos de criopreservação são glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e a sacarose (SANTOS, SALOMÃO, 2010).

O tipo de crioprotetor, a concentração e o tempo de exposição do material podem resultar em efeito tóxico, o que requer conhecer o mecanismo de ação e efeitos danosos que essas substâncias possam causar (ARAÚJO et al., 2019).

O uso do DMSO tem sido relatado com efeito citotóxico como crioprotetor para algumas espécies (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). Essa substância provoca alterações na membrana celular, o que danifica e inviabiliza as células (HUBÁLEK, 2003). Para diminuir essas alterações, quando se faz necessário o uso dessa substância, é possível preparar soluções adicionando outras soluções crioprotetoras de menor toxicidade celular, como a solução de PSD composta por 20% PEG 4000, 20% de sacarose e 20% DMSO. Na criopreservação de PCH x PEE, o uso do DMSO a 5% e da solução PSD a 5%, não tiveram diferenças significativas na taxa de crescimento, mas o uso do PSD apresentou maiores valores (NUNES et al., 2017).

A sacarose quando associada em soluções de crioproteção é um ótimo agente crioprotetor, pois não apresenta citotoxicidade, mesmo quando acumulada em grande quantidade no citoplasma (DUMET et al., 1993). Em concentrações elevadas ela diminui o conteúdo de água do ambiente celular, atuando como agente osmótico, removendo o excesso de água de dentro da célula (SANTOS, 2000).

Outra solução crioprotetora que vem sendo utilizada recentemente é a *Plant vitrification solution (PVS) n° 3* ou solução de vitrificação de plantas (SVP) 3, que não utiliza o DMSO, sendo composta de 40% de glicerol e 40% de sacarose, tornando uma solução de baixa toxicidade celular e sendo empregada para criopreservação de diversas espécies (DENNISTON et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2014).

## 2.5 FUNGOS ENDOFÍTICOS

A crescente demanda pela indústria madeireira, reflete diretamente na produção de mudas, ocasionado um aumento na produção e na necessidade de evitar danos que venham causar quedas na produção e na produtividade das mudas (SANTOS et al., 2011).

A necessidade de se conhecer e de controlar os potenciais patógenos oriundos de sementes para a produção de mudas, serve para evitar a perda de material e a disseminação do patógenos para outras áreas (MENTEN, 1991). O conhecimento das populações de fungos endofíticos e suas interações com as plantas hospedeiras e o meio ambiente é o passo inicial para a adoção de técnicas agrícolas mais seguras, econômicas e rentáveis.

Os fungos patogênicos podem estar presente em sementes tanto na superfície quanto em tecidos internos. Se a presença do patógeno for externa, os danos serão notados nas fases iniciais, já se for interna, a transmissão a plântula é mais eficaz. A presença de fungos patogênicos em sementes pode causar diversos danos tanto a semente quando a plântula, como morte do embrião, morte em pré e pós-emergência, podridão radicular, tombamento de mudas, entre outros sintomas (NEERGAARD, 1979). Doenças como tombamento de mudas e podridão de raízes estão entre as mais comuns associadas a transmissão de fungos as sementes (CARNEIRO, 1987).

A origem do termo, microrganismo endofítico, foi utilizado primeiramente por Bary, em 1866, que definiu a diferença entre eles e os patógenos de plantas. Microrganismos endofíticos, são todos aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar prejuízo ao hospedeiro, e que não desenvolvem estruturas externas visíveis (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Um dos microrganismos mais comumente isolados como endófitos são os fungos (STROBEL; DAISY, 2003). Fungos endofíticos, são aqueles que pelo menos durante uma fase do

seu ciclo de vida, habitam o interior dos tecidos de seus hospedeiros, sem demonstrar quaisquer sintomas visíveis (ARAÚJO et al., 2002).

Dentre os fungos endofíticos patogênicos de *Pinus* que são transmitidos via semente, podemos citar o gênero *Fusarium* sp. (CARMO, 2017), e a espécie *Diplodia pinea* (BASILIO, 2013).

**CAPÍTULO 1 – EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E CRIOPRESERVAÇÃO DE  
MASSAS EMBRIOGÊNICAS DO HÍBRIDO *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P.*  
*caribaea* var. *hondurensis*.**

## RESUMO

A embriogênese somática é um processo no qual, com os estímulos necessários, ocorre um processo de dediferenciação e rediferenciação celular, a partir do qual podem ser formados embriões a partir de células somáticas, sem que ocorra a fusão de gametas. Este trabalho teve como objetivo a otimização de um protocolo de embriogênese somática e de criopreservação de massas embriogênicas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*. Para tanto, foi analisado o efeito do genótipo na fase de indução, e na fase de maturação foram realizados diferentes experimentos nos quais foram avaliadas diferentes composições de meio e estresses abióticos, e analisado o efeito de antibiótico (Clavulin e PPM™) na taxa de crescimento das massas embriogênicas. Para a criopreservação, foram avaliados, o efeito da concentração do crioprotetor PSD (20% PEG4000, 20% sacarose e 20% DMSO) e o tempo de exposição das massas embriogênicas em contato com o crioprotetor PVS3 (40% glicerol e 40% sacarose). Foi realizada a análise histoquímica para análise da presença de açúcares, proteínas e lipídios nas massas embriogênicas. O efeito dos antibióticos Clavulin e PPM no crescimento de massas embriogênicas do híbrido em estudo foi realizado. Houve diferenças entre as matrizes na formação de massas embriogênicas, e a melhor matriz apresentou 5,45±1,42% de indução. Para os experimentos de maturação, não foi observada a formação de embriões somáticos. As diferentes concentrações da solução do crioprotetor PSD, aos 30 dias, não apresentaram diferenças significativas. A solução PVS3 com exposição de 180 minutos, aos 30 e 90 dias, apresentou maior taxa de crescimento (20,44 ± 8,5% e 2698,3 ± 426,7%, respectivamente), quando comparado aos demais tratamentos. As massas embriogênicas apresentaram acúmulo de substâncias de reservas, em maior concentração nas células embriogênicas. O uso de antibióticos, Clavulin e PPM, no meio de proliferação, não apresentou diferença estatística nas taxas de crescimento das massas embriogênicas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*.

Palavras-chave: Maturação. Histoquímica. Crioprotetor. PSD. PVS3. Florestal.

## ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a process in which, if the necessary stimuli is given, cellular dedifferentiation and redifferentiation occurs and embryos can be formed from somatic cells without the fusion of gametes. This work aimed to optimize a protocol for somatic embryogenesis and cryopreservation of embryogenic masses of *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*. Therefore, the effect of the genotype in the initiation phase was evaluated, and in the maturation phase several experiments were carried out to evaluate different compositions of media and abiotic stresses, as well as the effect of antibiotics (Clavulin and PPM™) on the growth rate of embryogenic masses. Regarding the cryopreservation, the effect of the concentration of the cryoprotectant PSD (20% PEG4000, 20% sucrose and 20% DMSO) and the exposure time of the embryogenic masses to the cryoprotectant PVS3 (40% glycerol and 40% sucrose) were evaluated. Histochemical analyses were performed to evaluate the presence of sugars, proteins and lipids in the embryogenic masses. The effect of the

antibiotics Clavulin and PPM on the growth of embryogenic masses was evaluated. There were differences between the families regarding the initiation of embryogenic masses, and the best family reached up to  $5.45 \pm 1.42\%$ . In the maturation experiments, the development of somatic embryos was not observed. The concentrations of the PSD cryoprotectant solution, after 30 days did not show statistical differences. The masses exposed to PVS3 solution for 180 minutes showed the higher growth rate after 30 and 90 days ( $20.44 \pm 8.5\%$  and  $2698.3 \pm 426.7\%$ , respectively), when compared to the other treatments. We observed accumulation of reserve substances in the embryogenic cells of the masses. The use of the antibiotics Clavulin and PPM in the proliferation medium did not affect the growth rate of *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*.

Keywords: Maturation. Histochemical. Cryoprotectant. PSD. PVS3. Forest.

## 1 INTRODUÇÃO

O reflorestamento brasileiro com espécies exóticas é formado basicamente por dois gêneros florestais, o eucalipto, plantado em maior quantidade (6,97 milhões de hectares) e o pínus que possui a segunda maior área de plantio (1,64 milhões de hectares) (IBÁ, 2020). O pínus apresenta diversas aplicações comerciais, como a utilização da madeira, produção de celulose e extração de resina (SANTOS et al., 2016).

Para atender essa demanda do mercado, o *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* é um exemplo de híbrido que apresenta alta precocidade e maior produtividade por hectare, além de melhor qualidade de madeira e resina. Devido a essas características positivas, a busca por mudas do híbrido tem aumentado, e a sua propagação via sementes e por estaquia, não apresentam resultados satisfatórios. Espécies do gênero *Pinus* apresentam dificuldades para se propagar vegetativamente, limitando o melhoramento florestal e a sua propagação massal (BIERNASKI et al, 2017).

Para contornar esse problema, novas técnicas estão sendo empregadas para auxiliar na propagação do pínus. Na cultura de tecidos, técnicas vêm ganhando destaque devido ao sucesso na obtenção de mudas clonais de pínus, entre essas técnicas destaca-se a embriogênese somática.

A embriogênese somática é considerada a técnica mais promissora para a produção em larga escala, principalmente em genótipos superiores de coníferas que foram resultados de programas de melhoramento genético. Alguns protocolos de embriogênese somática já foram desenvolvidos para algumas espécies de *Pinus*, como *P. elliottii* (NEWTON et al., 2005), *P. taeda* (TANG; NEWTON, 2005) e *P. patula* (FORD et al., 2005).

Em coníferas o estabelecimento de florestas clonais usando a técnica de embriogênese somática permitiu ganhos genéticos de 40-60% em volume, por meio da seleção dentro de famílias (SUTTON, 2002). A definição de protocolos 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 conversão (PULLMAN; BUCHANAN, 2006).

Além da viabilidade na produção de mudas, a técnica de embriogênese somática pode ser utilizada para criopreservação de seus embriões somáticos ou de suas massas embriogênicas, que permite a conservação por longos períodos e a baixo custo.

A criopreservação é definida como a conservação de material biológico em temperaturas ultrabaixas (-196° C), sendo as vantagens deste sistema de conservação o custo, a estabilidade genética e a segurança do material conservado (ENGELMANN, 2004).

Para que haja êxito na criopreservação, as células devem passar por procedimentos, com o uso de crioprotetores que visam alcançar o congelamento evitando a formação de cristais de gelo intracelular, o qual causa a ruptura das membranas celulares, resultando em morte celular. Para atingir esse sucesso da criopreservação, várias técnicas e protocolos têm sido estudados, juntamente com a escolha e as concentrações de reagentes para verificar se ocorre o risco de citotoxicidade e o tempo de exposição do material ao crioprotetor.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo de embriogênese somática e de criopreservação de massas embriogênicas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

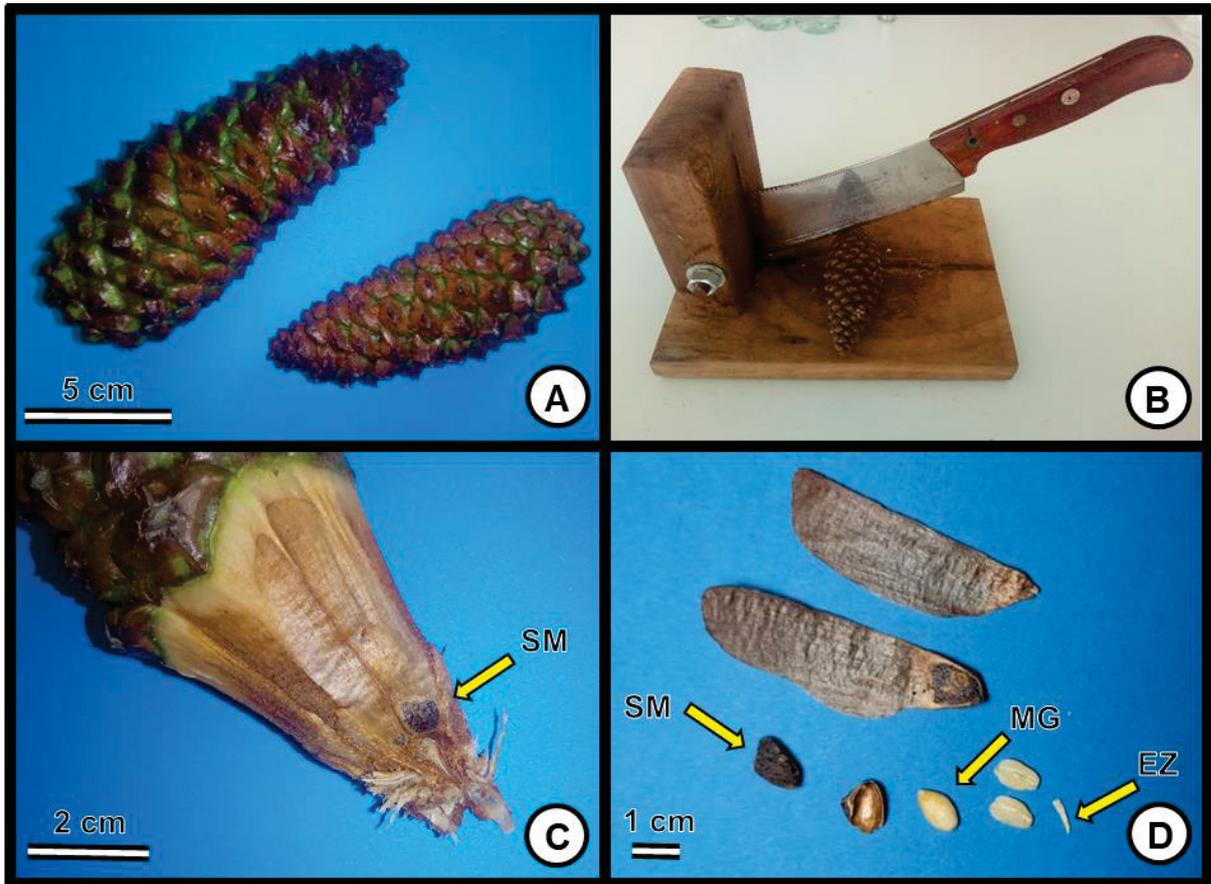
### 2.1 LOCAL DE PESQUISA

Os experimentos de embriogênese somática e criopreservação foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação, da Embrapa Florestas, Colombo – PR.

### 2.2 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados cones (estróbilos femininos) imaturos coletados em Área Experimental do Programa de Melhoramento Genético de Pínus da Embrapa Florestas (Lat 25°19'25.34"S Long 49°9'41.50"O), que tem como objetivo a seleção de árvores para madeira e resina do híbrido *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*. Foram realizadas quatro coletas de cone imaturos, duas ocorrendo no ano de 2019 (29-30/01 e 11/02), uma em 2020 (28/01), e uma em 2021 (14/01). Os estróbilos coletados foram separados por matrizes, embalados em papel Kraft e em saco plástico, sendo em seguida encaminhados ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação. Assim que recebidas, as amostras foram armazenadas em geladeira ( $4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) até a extração das sementes e o estabelecimento dos experimentos (FIGURA 2).

FIGURA 2 – Processo de extração do megagametófito desde o cone imaturo de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliottii* var. *elliottii*, Embrapa (Colombo-PR).



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: A – Cones imaturos; B – Método utilizado para extração das sementes imaturas (guilhotina); C – Posição da semente (SM) no cone; D – Semente (SM), Megagametófito imaturo (MG) e Embrião zigótico (EZ).

## 2.3 INDUÇÃO E PROLIFERAÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

### 2.3.1 Efeito do genótipo na indução da embriogênese somática

Para avaliação do efeito do genótipo foram coletados de 2 a 29 cones por família, num total de 12 matrizes, totalizando 204 cones (TABELA 1).

TABELA 1 – Relação das matrizes coletadas por ano e o total de megagametófitos imaturos inoculados de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliottii* var. *elliottii*, Embrapa (Colombo-PR).

Matrizes	Ano	Total de megagametófitos imaturos inoculados
C13L25	2019	113
<b>C12L29</b>	2019	289
<b>C10L04</b>	2019	190
C02L14	2019	38
C01L10	2019	202
C08L15	2019	15
C12L13	2019	4
C08L28	2019	60
C13L02	2019	7
C11L08	2019	18
C03L32	2019	30
5 Cones de genótipos desconhecidos	2020	287
<b>C12L29</b>	2021	114
<b>C10L04</b>	2021	62
C07L16	2021	73
C01L31	2021	376
	TOTAL	966

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: As matrizes destacadas em negrito foram coletadas nos anos de 2019 e 2021

Após a abertura dos cones (FIGURA 1 – B-C), as sementes foram levadas para a câmara de fluxo laminar, onde foram realizadas as seguintes etapas de desinfestação: imersão em etanol 70% por 50 segundos, imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 40 minutos sob agitação manual, imersão em tiofanato metílico (Cercobin® 700 WP) 1,5% (m/v), por 30 minutos sob agitação manual, seguida por lavagem em água deionizada e autoclavada.

Após a assepsia, com o auxílio de pinça e bisturi, os megagametófitos foram extraídos cuidadosamente das sementes imaturas (FIGURA 1 – D, MG), sendo em seguida introduzidos em placas de Petri (90x15 mm) contendo 25 mL de meio de

cultura mLV padrão, composto por sais e vitaminas do meio mLV (LITVAY et al. 1985), suplementado com glutamina (500 mg L<sup>-1</sup>), caseína hidrolisada (1.000 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e Gelrite™ (4 g L<sup>-1</sup>), acrescidos dos reguladores de crescimento, 4,5 µM de 6-benzilamino purina (BAP) e 9 µM de ácido diclorofenóxiacético (2,4-D), conforme o protocolo de Nunes et al (2017). O pH do meio foi ajustado em 5,8, sendo em seguida, autoclavado a 121°C e 1 atm de pressão, por 15 minutos. O material foi incubado em BOD a 23 ± 2°C, no escuro, por até 18 meses.

Após a extrusão do embrião ou a formação de massas embriogênicas, o material foi isolado do explante inicial e transferidos para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura utilizado na etapa da indução, sendo repicadas a cada 14 dias para meio fresco de mesma composição, e mantido nas mesmas condições de incubação.

## 2.4 ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS

Foi considerada linhagem embriogênica, cada massa provinda de um único megagametófito que proliferou em meio de cultura por 4 subcultivos (8 semanas) cada. De cada linhagem foi retirada uma amostra, a qual foi utilizada para o teste histoquímico com carmim acético 2% e azul de Evans 0,1% (descrito no item 3.6) visando confirmar a característica embriogênica das massas.

Foi realizada a coloração com carmim acético e azul de Evans, evidenciando os pró-embriões (caracterizados por células pequenas, redondas e citoplasma denso – coradas de vermelho) e as células do suspensor (alongadas e altamente vacuoladas – coradas de azul), formando um tecido embrionário típico.

Cada linhagem embriogênica foi identificada e individualizada, sendo proliferada em meio de mesma composição do meio de indução, com repicagens a cada 14 dias.

## 2.5 MATURAÇÃO

### 2.5.1 Efeito do pulso térmico sobre a maturação

Foi avaliado o efeito da temperatura sobre a maturação dos tecidos embriogênicos. Para tal, foram utilizadas três linhagens denominadas como LNJA01, LNJA04 e LNJA05, a partir das quais foram preparadas suspensões celulares de

tecido embriogênico em meio líquido composto de sais e vitaminas do meio mLV, suplementado com glutamina (500 mg L<sup>-1</sup>) e caseína hidrolisada (1.000 mg L<sup>-1</sup>). A seguir, 200 mg de peso fresco de massa embriogênica foram suspensos em 3 mL de meio mLV líquido. Para cada placa contendo um disco de papel filtro de 55 mm de diâmetro e 80 g m<sup>-2</sup> (JProlab®) autoclavado sobre o qual foi pipetado 1 mL da suspensão e colocado sobre uma camada de papel filtro para absorver o excesso de meio de cultura. Em seguida, o disco foi colocado sobre o meio padrão de maturação.

O meio de maturação padrão foi composto pelos sais e vitaminas do meio mLV, suplementado com glutamina (500 mg L<sup>-1</sup>), caseína hidrolisada (1.000 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (60 g L<sup>-1</sup>) e Gelrite™ (9 g L<sup>-1</sup>), acrescido de 40 µM de ácido abscísico (ABA) conforme Nunes et al (2017).

As placas foram então acondicionadas em estufa de cultura bacteriológica TLK 48 (De Leo), onde foram submetidas aos tratamentos térmicos (Controle (23 °C); 40 °C por 30 min; 50 °C por 15 min e 60 °C por 5 min) (adaptado NASCIMENTO et al., 2020). Posteriormente, as placas foram mantidas em BOD a 23 ± 2°C, em ambiente escuro, por 12 e 16 semanas até o momento da avaliação. Cada tratamento foi composto por 3 repetições (3 placas/tratamento).

### **2.5.2 Efeito da dessecação parcial do tecido embriogênico sobre a maturação**

Para avaliar o efeito da dessecação parcial sobre a maturação, as massas embriogênicas após inoculadas em meio de maturação foram expostas à ventilação forçada da câmara de fluxo laminar horizontal. Para tal, as placas contendo o material foram deixadas semiabertas sobre a bancada da câmara de fluxo laminar horizontal por tempo variável, de acordo com cada tratamento. (TABELA 2)

O meio de cultura e o preparo da suspensão celular ocorreram conforme descrito no item 2.5.1. Contudo, o meio líquido mLV foi modificado consistindo em meia concentração de sais e vitaminas mLV, suplementado com 1.000 mg L<sup>-1</sup> caseína hidrolisada, 20 g L<sup>-1</sup> sacarose e 10 g L<sup>-1</sup> carvão ativado conforme o protocolo adotado por Nunes et al (2017). Foram testadas as linhagens LNJA01, LNJA07 e LNJA10, conforme a tabela a seguir (TABELA 2):

TABELA 2 – Tratamentos aplicados na dessecação parcial de massas embriogênicas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* relacionando o tempo de exposição a câmara de fluxo laminar e a linhagem testada. Embrapa (Colombo-PR)

Tratamento	Linhagens		
	LNJA01	LNJA07	LNJA10
Controle (sem exposição)	T1	T7	T13
2 horas	T2	T8	T14
4 horas	T3	T9	T15
4 horas (mLV padrão líquido)	T4	T10	T16
6 horas	T5	T11	T17
16 horas	T6	T12	T18

FONTE: O Autor (2021)

Cada tratamento foi composto por 3 repetições, sendo utilizado 3 placas/tratamento contendo aproximadamente 60 mg de células em cada placa, totalizando 18 tratamentos. Após cada tempo de exposição, as placas foram vedadas e identificadas, mantidas em BOD a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , no escuro, por 16 semanas.

### 2.5.3 Efeito do carvão ativado, Gelrite™ e da sacarose sobre a maturação

Foram avaliadas três concentrações de carvão ativado (0; 2,5 ou 5 g L<sup>-1</sup>), associadas a três concentrações de Gelrite™ (6; 9 ou 12 g L<sup>-1</sup>) e duas concentrações de sacarose (60 ou 90 g L<sup>-1</sup>), adicionadas ao meio de maturação mLV padrão com 40 µM de ABA. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial. As concentrações foram avaliadas sobre as linhagens LNJA01 e LNJA07. Cada tratamento foi composto por 3 repetições, onde em cada placa foram adicionados aproximadamente 60 mg de massa embriogênica, totalizando 36 tratamentos.

### 2.5.4 Efeito do polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) sobre a maturação das massas embriogênicas

Para a avaliação do PEG 4000, em meio de maturação mLV padrão foram avaliadas duas concentrações de PEG 4000 (10 e 15 g L<sup>-1</sup>) e um tratamento

testemunha, onde foram utilizadas as linhagens LNJA01, LNJA03 e LNJA15, totalizando 9 tratamentos com 3 repetições cada (placa contendo aproximadamente 60 mg de massa embriogênica). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado.

### **2.5.5 Efeito dos carboidratos, sacarose e maltose sobre a maturação**

Foram avaliadas três concentrações de dois açúcares no meio de maturação mLV padrão, sacarose e/ou maltose (60; 30+30 ou 60 g L<sup>-1</sup>), acrescido de 80 µM L<sup>-1</sup> de ABA e 9 g L<sup>-1</sup> Gelrite™. Foram avaliadas as linhagens LNJA01, LNJA03 e LNJA15, totalizando 9 tratamentos com 3 repetições cada (placa contendo aproximadamente 60 mg de massa embriogênica). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado.

### **2.5.6 Efeito da concentração de ABA na maturação do tecido embriogênico**

Foram avaliadas três concentrações de ABA (40, 80 ou 120 µM L<sup>-1</sup>) no meio de maturação mLV padrão. Foram testadas as linhagens LNJA01, LNJA03 e LNJA15, totalizando 9 tratamentos com 3 repetições cada (placa contendo aproximadamente 60 mg de massa embriogênica). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado.

### **2.5.7 Efeito do meio de cultura na maturação do tecido embriogênico**

Foram avaliados dois meios de cultura, o meio mLV padrão suplementado com 60 g L<sup>-1</sup> sacarose e 9 g L<sup>-1</sup> Gelrite™ e o meio QL suplementado com 1.000 mg L<sup>-1</sup> glutamina, 1.000 mg L<sup>-1</sup> caseína hidrolisada, 100 mg L<sup>-1</sup> ácido fólico, 400 mg L<sup>-1</sup> tiamina HCl, 1.000 mg L<sup>-1</sup> glicina, 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, 1.500 mg L<sup>-1</sup> carvão ativado, 100 g L<sup>-1</sup> PEG 4000 e 6,5 g L<sup>-1</sup> ágar. Ambos com concentração de 120 µM L<sup>-1</sup> de ABA.

Para este ensaio, foi utilizada a linhagem LNJA02, o qual o material foi disposto em 10 pequenos aglomerados equidistantes diretamente sobre o meio de cultura em placas de Petri, de 90 mm, sem a utilização de papel filtro. Foram realizados dois tratamentos com três repetições cada.

Em todos os experimentos de maturação, os tratamentos foram avaliados quanto ao desenvolvimento de embriões somáticos após 12 e 16 semanas.

## 2.6 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os meios de cultura tiveram o pH ajustado em  $5,8 \pm 0,02$  e foram autoclavados a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 1 atm de pressão, por 15 min. Após o preparo dos tratamentos os experimentos foram mantidos em BOD a  $23 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em ambiente escuro, por 12 e 16 semanas quando foram realizadas as avaliações.

## 2.7 AVALIAÇÕES DOS EXPERIMENTOS DE MATURAÇÃO

Foi avaliada a formação de embriões somáticos em cada tratamento de maturação. Os experimentos foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de normalidade, seguido de variância e a comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas por meio do software estatístico ASSISTAT, versão 7.7 beta (SILVA, 2014).

## 2.8 TESTES HISTOQUÍMICOS

Foram realizados testes histoquímicos para avaliar a característica embriogênica das massas na proliferação. Para tanto, células de massas frescas, 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 Valente (2007).

Para análise de polissacarídeos totais foi realizado a reação de PAS (Periodic Acid Schiff) por 15 min no escuro (McMANUS, 1948). Foi realizada a coloração com lugol 1%, por 10 min, para a verificação de grânulos de amido (JENSEN, 1962). As células também foram submetidas à coloração acética (7%) com Azul de Coomassie (0,25%), por 10 min, para a verificação de proteínas totais (FISCHER, 1968) e a coloração com Vermelho de Sudan III, por 30 min, para analisar a presença de lipídeos totais (PEARSE, 1972).

A coloração das células foi visualizada em microscópio estereoscópio (Micronal®) e as imagens capturadas em uma câmera fotográfica acoplada ao mesmo microscópico do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas.

## 2.9 CRIOPRESERVAÇÃO

### 2.9.1 Efeito da concentração da solução crioprotetora PSD (20% PEG 4000, 20% Sacarose e 20% DMSO), lavagem do crioprotetor do tecido embriogênico e da criopreservação

Este experimento, foi realizado com massas embriogênicas das linhagens LNJA02 e LNJA07 sendo utilizados 2,8 g do tecido embriogênico, os quais foram transferidos para um tubo Falcon de 50 mL ao qual foi adicionado 7,3 ml do meio mLV líquido + 0,4 M de sorbitol. Na sequência, os tubos foram incubados em shaker por 16 h no escuro, a 23 °C e 120 rpm. Após 24 horas, os tubos foram colocados sobre gelo por 30 min e em seguida foi adicionada a solução crioprotetora PSD (20% PEG 4000; 20% Sacarose e 20% DMSO), gota a gota por 30 min, até obter as concentrações de 5% e 7,5% (para 2 tratamentos). Os tubos foram mantidos no gelo por 30 min, sob agitação manual.

Para os tratamentos que seguiram para a criopreservação foi pipetado 1,5 mL da suspensão ( $\pm$  400 mg de células) em cada criotubo, os quais foram acomodados no Mr. Froosty® e levados para o freezer a -80 °C por 24 h.

Para os tratamentos que não foram submetidos à criopreservação, 1,5 mL da suspensão foi colocada em disco de papel filtro de 55 mm (JProlab®). As suspensões em disco de papel foram submetidas aos tratamentos, sem lavagem e com lavagem. Para o tratamento sem lavagem, os discos com as células foram pesados e colocados em contato com o meio mLV padrão em placa de Petri. Para o tratamento com lavagem, foram vertidos aproximadamente 3 mL de meio mLV líquido (contendo apenas sais e vitaminas) sobre o aglomerado de células, com a finalidade de lavar e retirar o crioprotetor, e em seguida, prosseguiu-se conforme o tratamento sem lavagem.

As suspensões submetidas ao tratamento de criopreservação, após o tempo no ultrafreezer a -80 °C foram retiradas do Mr. Froosty® e mergulhadas em nitrogênio líquido por 4 h. Após esse período, os criotubos, foram levados para banho-maria a

40 °C por aproximadamente 2 minutos (até descongelar), em seguida foram acondicionadas sobre gelo, e então seguiram os procedimentos conforme descrito para os tratamentos sem criopreservação, “sem e com lavagem”.

Foi utilizado como controle massas embriogênicas em 3 repetições de  $\pm$  400 mg de massa fresca transferidas diretamente para placas com mLV padrão.

Para a linhagem LNJA02 foram realizados 8 tratamentos (2 concentrações de PSD x 2 procedimentos x 2 condições) + Controle, e para a linhagem LNJA07 foram realizados 4 tratamentos (2 concentrações de PSD x 1 procedimento x 2 condições) + Controle, não sendo realizado o procedimento de lavagem. Cada tratamento foi realizado em triplicata, cada disco contendo as massas embriogênicas foram pesadas e seguiram para incubação em BOD a 23 °C, no escuro. Após 30 dias o material foi avaliado por meio de pesagem, dos discos contendo as massas embriogênicas.

### **2.9.2 Efeito do tempo do tecido embriogênico na presença do crioprotetor PVS3 (40% de glicerol + 40% de sacarose, em meio mLV) e da criopreservação no tecido embriogênico**

Foram realizados 10 tratamentos nos quais foram avaliados o tempo de contato do tecido embriogênico com o crioprotetor PVS3 (REED et al., 2010; composição: 40% de glicerol + 40% de sacarose, em meio mLV) (0, 1, 2, 3 e 4 h) e o efeito da criopreservação. Para esse experimento foi utilizada a linhagem LNJA02.

Para cada tratamento, contendo cinco repetições, foram utilizados 2 g de massa embriogênica fresca ( $\pm$  400 mg/repetição), as quais foram transferidas para uma placa contendo meio de pré-cultura (sais e vitaminas do meio mLV suplementado com 500 mg L<sup>-1</sup> glutamina, 1.000 mg L<sup>-1</sup> caseína hidrolisada, 0,3 M sacarose e 2,5 g L<sup>-1</sup> Gelrite™). As placas foram incubadas por 2 h, a 23 °C no escuro e após esse período na câmara de fluxo laminar, as massas foram transferidas para tubo Falcon de 50 mL, e submersas em meio líquido de osmoproteção (sais e vitaminas do meio mLV suplementado com 500 mg L<sup>-1</sup> glutamina, 1.000 mg L<sup>-1</sup> caseína hidrolisada, 0,4 M sacarose e 2 M glicerol), por 20 min, a temperatura ambiente (25  $\pm$  2°C). Em seguida, as massas foram filtradas e colocadas em contato com o meio mLV líquido contendo o crioprotetor PVS3, sendo mantido por diferentes tempos (0, 1, 2, 3 e 4 h).

Para os tratamentos que seguiram para a criopreservação, foi pipetado 1,5 mL da suspensão e acondicionado em criotubos, os quais foram mergulhados em nitrogênio líquido por 24 h.

Os tratamentos que não foram submetidas ao nitrogênio líquido, seguiram para o processo de Unloading, no qual o material foi colocado em contato com o meio mLV líquido com 1,2 M de sacarose, por 20 minutos e após esse processo o material foi filtrado em duplo disco de papel filtro de 55 mm, com uma camada extra de papel filtro para absorver o excesso de meio. Em seguida o material (massas + papel filtro) foi pesado e este é colocado sobre o meio de cultura mLV padrão e incubado em BOD, a 23 °C em ambiente escuro.

Para os tratamentos submetidos à imersão em nitrogênio líquido, os criotubos foram retirados e levados ao banho-maria por 2 min a 40 °C. Após o descongelamento do material, seguiram pelo mesmo processo de Unloading, pesagem e incubação.

Após 30 dias o material foi avaliado por meio de pesagem, sendo realizada novamente a avaliação aos 90 dias.

## 2.10 EFEITO DA AÇÃO DO CLAVULIN<sup>®</sup> E DO PPM<sup>™</sup> NO CRESCIMENTO DO TECIDO EMBRIOGÊNICO

Este experimento foi realizado com a linhagem LNJA02, na qual foi avaliado o efeito do antibiótico Clavulin<sup>®</sup> (850 mg g<sup>-1</sup> Amoxicilina + 150 mg g<sup>-1</sup> Clavulanato de potássio) e do biocida Plant Preservative Mixture<sup>™</sup> (PPM<sup>™</sup>). Para tanto, foram realizados os seguintes tratamentos: Controle (sem tratamento), Clavulin<sup>®</sup> (200 mg L<sup>-1</sup>) ou PPM<sup>™</sup> (0,05%), adicionados ao meio de proliferação mLV padrão. Cada tratamento foi composto por 3 repetições, que consistiu em aproximadamente 2 g de massa fresca para cada repetição, que foi pesada e colocada em contato com o meio de cultura. As placas foram incubadas em BOD a 23 °C, no escuro.

Após 14 dias foi realizada novamente a pesagem para avaliar o efeito no crescimento da cultura e a presença ou não de atividade microbiana.

## 2.11 AVALIAÇÕES

Foi avaliada a taxa de crescimento em cada tratamento de criopreservação e do efeito de antibiótico, através da pesagem das massas. Os experimentos foram

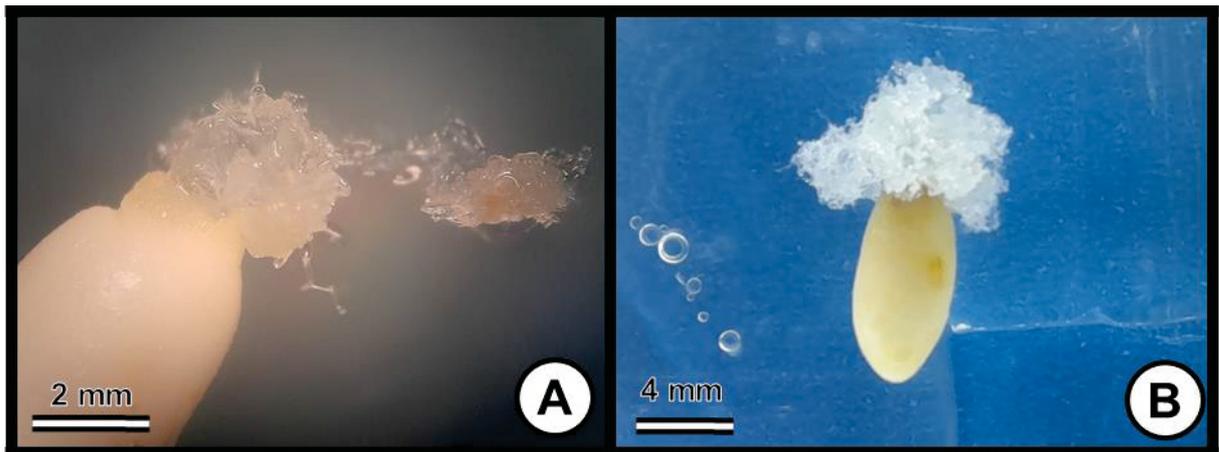
realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de normalidade, seguida de análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas por meio do software estatístico ASSISTAT, versão 7.7 beta. (SILVA, 2014).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 EFEITO DO GENÓTIPO NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Foi avaliada a formação de massas pró-embriogênicas nas matrizes coletadas em 2019 e 2021. Das 11 matrizes utilizadas no ano de 2019, três matrizes apresentaram formação de massa pró-embriogênica, sendo observada em um explante a extrusão pela micrópila. No ano de 2021 foram utilizadas quatro matrizes, para as quais todas tiveram formação de massa pró-embriogênica e um explante com extrusão pela micrópila (da mesma matriz do ano de 2019) (FIGURA 3).

FIGURA 3 – Extrusão e formação da massa embriogênica de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var *hondurensis*. Colombo – PR.



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: A – Início da extrusão pela micrópila; B – Formação da massa embriogênica.

Para fins estatísticos, as matrizes não responsivas foram retiradas das análises. As matrizes diferiram estatisticamente quanto a porcentagem de indução e formação de massa embriogênica (TABELA 3).

TABELA 3 – Taxa de indução da embriogênese somática em relação a genótipos responsivos de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var *hondurensis* nos anos de 2019 e 2021. Colombo – PR.

<b>Matrizes</b>	<b>Código Campo</b>	<b>Ano</b>	<b>n</b>	<b>% de indução</b>
M01	C13L25	2019	11	5,45 ±1,42 a
M02	C12L29	2019	28	3,93 ±0,89 a
M03	C10L04	2019	19	0,53 ±1,08 b
M02	C12L29	2021	11	3,64 ±1,42 ab
M03	C10L04	2021	6	3,33 ±1,92 ab
M04	C07L16	2021	5	2,00 ±2,10 ab
M05	C01L31	2021	37	5,14 ±0,77 a

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: n – número de placas contendo 10 megagametófitos. As Matrizes em destaques foram responsivas nos 2 anos de coleta. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Das 12 matrizes utilizadas nesse trabalho, cinco foram responsivas e apresentaram diferenças estatísticas na porcentagem de indução, revelando que há influência do genótipo na indução da embriogênese somática (ES). As matrizes M01 e M05 apresentaram as maiores porcentagens, e a matriz M03 no ano de 2019 a menor taxa de indução.

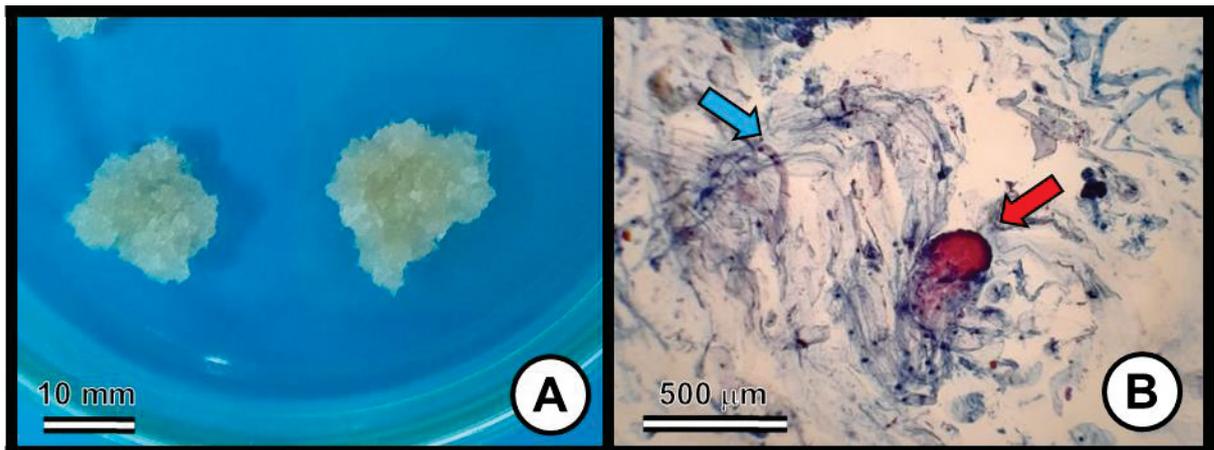
Em diferentes genótipos do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* var *hondurensis* houve diferenças na etapa de indução, da qual das cinco matrizes estudadas, três apresentaram resultados superiores às demais (NUNES et al, 2017). Sestrem (2018) em *P. caribaea* var. *hondurensis*, também notou essa diferença, das oito matrizes utilizadas, quatro apresentaram maiores porcentagens na formação de massa embriogênica e Malabadi et al. (2011) quando utilizaram o embrião maduro de *P. caribaea*, das cinco matrizes, nenhuma respondeu ao tratamento controle. Para *P. elliottii*, Liao e Amerson (1995) notaram que das quatro matrizes utilizadas, houve diferenças nas porcentagens de formação de massas embriogênicas.

Outras espécies de *Pinus* apresentaram diferenças na formação de massas embriogênicas com relação ao genótipo, como *P. patula* Schiede ex Schldl. & Cham, que apresentaram diferenças entre cinco matrizes analisadas e uma baixa porcentagem (0,99%) de iniciação de ES (JONES, VAN STADEN, 1995), para o *P. radiata* D. Don, três matrizes apresentaram maiores valores de indução (20,6; 20,6 e 20,1%) (MONTALBÁN et al., 2011).

### 3.2 ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS

No ano de 2019 foram obtidas 16 linhagens embriogênicas e no ano de 2021, 26. Foram consideradas linhagens embriogênicas as que sobreviveram no meio de proliferação por pelo menos oito semanas (quatro repicagens) (NUNES et al, 2017). A coloração para a verificação de massas pró-embriogênicas também foi realizado em *P. taeda* e *P. oocarpa* Schiede ex Schltdl. (LARA-CHAVEZ et al., 2012), *P. patula* (FORD et al., 2005), *P. thunbergii* Parl. (SUN et al., 2021), *P. caribaea* var. *hondurensis* (ZANELLA, 2016; SESTREM, 2018) e para o híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea* var *hondurensis* (NUNES et al., 2017), no qual foram observadas a capacidade embriogênica das massas.

FIGURA 4 – Massa embriogênica de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var *hondurensis* e coloração de carmim acético e azul de Evans. Colombo – PR.



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: A – Massa embriogênica; B – Pró-embrião (Seta vermelha – células embriogênicas, Seta azul – células do suspensor)

### 3.3 MATURAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS

Foram testados os efeitos de diferentes pulsos térmicos, tempos de dissecação parcial, concentrações e tipos de agentes osmóticos, concentrações de ABA, e meios de cultura. Dos experimentos realizados após 12 e 16 semanas não foram observados a formação de embriões somáticos.

A influência da temperatura na etapa de maturação da embriogênese somática, vem sendo estudada, na formação de embriões somáticos e na influência

na fase de conversão (ARRILLAGA, et al, 2019; KVAALEN, JOHNSEN, 2008; MONCALEÁN et al, 2018). Em *P. halepensis* Mill. a temperatura de 40° C apresentou uma menor formação quando comparado ao controle (23° C), a 50° C e a 60° C (NASCIMENTO et al., 2020). O uso das temperaturas 40° C e 50° C, não diferiram na formação de embriões somáticos de *P. radiata*, quando comparados ao controle (23° C), já a utilização de 60 °C apresentou uma menor formação (NASCIMENTO et al., 2020). Para *P. radiata*, a utilização de três temperaturas (18, 23 e 28° C) associadas a três concentrações de agente osmótico (concentração de Gelrite®) (8, 9 e 10 g L<sup>-1</sup>), apresentou uma baixa formação de embriões somáticos quando utilizado 8 g L<sup>-1</sup> de Gelrite® a 23 e 28° C, e 10 g L<sup>-1</sup> de Gelrite® a 28° C (MONCALEÁN et al, 2018). No presente trabalho os pulsos térmicos realizados com massas pró-embriogênicas, nas temperaturas de 40°C, 50°C e 60° C, por 30 min, 15 min e 5 min, respectivamente, adaptado de Nascimento et al. (2020) não apresentaram resultados para as linhagens testadas.

A utilização de agentes osmóticos, por exemplo, PEG, açúcares, como sacarose e maltose, e agentes solidificantes, como ágar e Gelrite®, são utilizados nessa fase de maturação e, em geral, apresentaram resultados positivos na formação de embriões somáticos. A utilização de PEG apresentou sucesso na fase de maturação de embriões em *P. pinaster* (MIGUEL et al., 2004), *P. armandii* Franch. (MARUYAMA et al., 2007), *P. brutia* Ten. (YILDIRIM et al., 2006) e *P. patula* (JONES, von STADEN, 2001). Em *P. taeda*, utilizando a maltose (4%) e o PEG (6%) obtiveram em média 95,3 embriões somáticos por grama de massa embriogênica (LI et al, 1998). A utilização de sacarose (6%) e de Gelrite® (0,9%), sem o uso de PEG, foi a melhor concentração para a formação de embriões de *P. pinaster* (RAMAROSANDRATANA et al, 2001). A formação de embriões somáticos de *P. strobus* L. utilizando sacarose (88 mM) e sorbitol (175 mM), acrescidos de 1% de Gelrite® foi alta em quatro linhagens, das cinco linhagens testadas (GARIN et al, 2000). Não foi observado a formação de embriões somáticos nas linhagens avaliadas para diferentes concentrações de sacarose (60 ou 90 g L<sup>-1</sup>), maltose (60 g L<sup>-1</sup>) e os dois carboidratos associados (30+30 g L<sup>-1</sup>) (adaptado de NUNES et al., 2017), para diferentes concentrações de PEG 4000 (10; 15 g L<sup>-1</sup>) e para diferentes concentrações de Gelrite® (6; 9 ou 12 g L<sup>-1</sup>).

Carneros et al. (2017) avaliaram o efeito da dessecação parcial em *P. pinea* L., expondo as massas embriogênicas em câmara de fluxo laminar por 2, 4, 6 e 24 h,

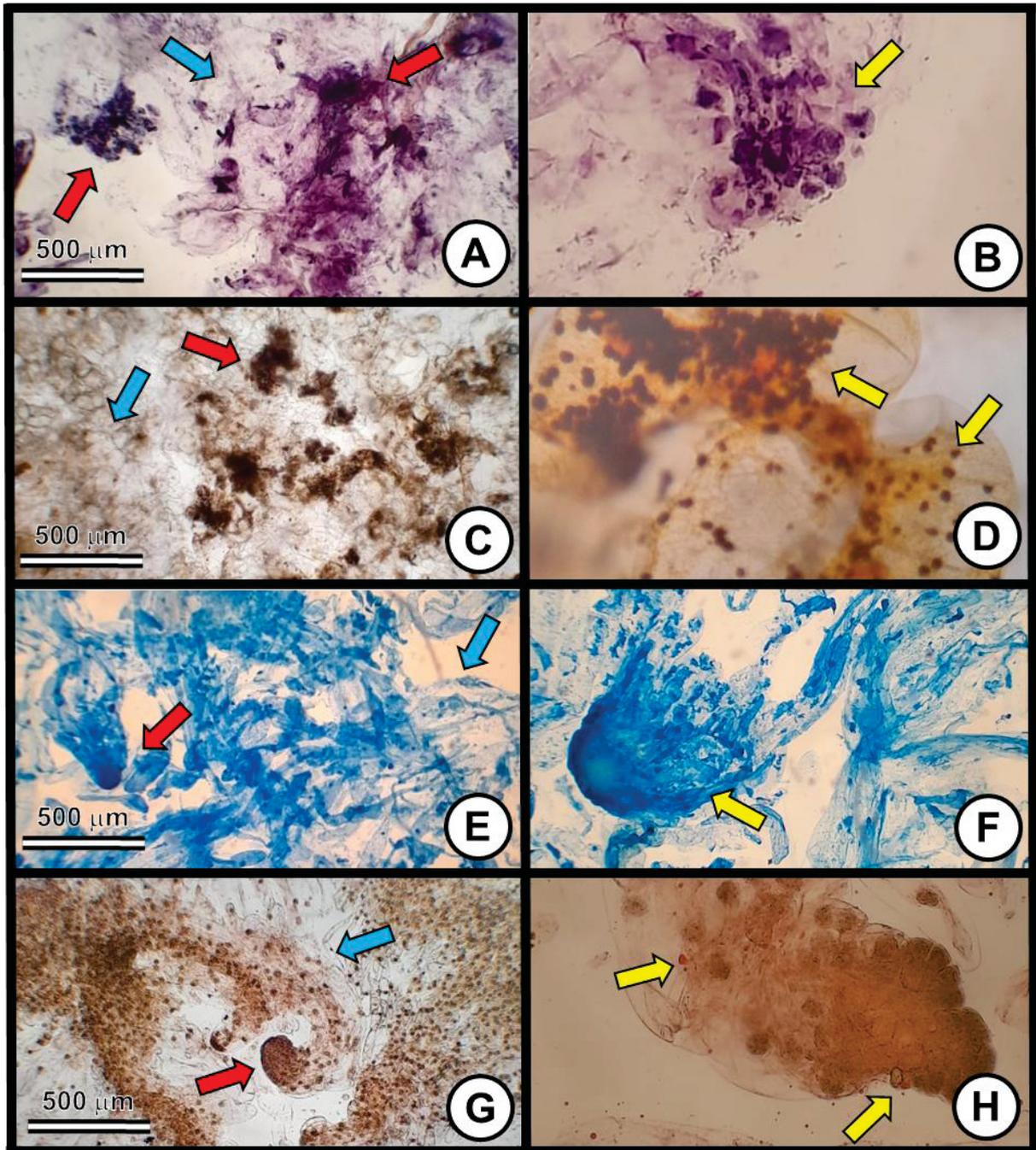
quando exposto a duas e quatro horas de dessecação parcial, a produção de embriões melhorou, embora não significativamente, e quando exposto por 24 h, houve uma alta desidratação das células, sem haver a formação de embriões. Nesse trabalho foram testados diferentes tempos de dessecação nos tempos de 2, 4, 6 e 16 h sob a câmara de fluxo laminar das três linhagens sem ocorrer a formação de embriões somáticos.

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal sintetizado preferencialmente pela rota dos carotenoides, e que tem seus níveis regulados no tecido vegetal por um preciso balanço entre sua biossíntese, catabolismo, divisão em compartimentos e transporte (TAIZ et al., 2017). A adição de ABA no meio de maturação promove o desenvolvimento de embriões e posteriormente a sua conversão em plântulas (LI et al., 1998). Experimentos utilizando diferentes concentrações de ABA são testadas, para verificar qual é a melhor concentração para a obtenção de embriões somáticos normais. Em *P. elliotii* x *P. caribaea* var *hondurensis*, quando avaliadas as concentrações de 40, 80 e 120  $\mu\text{M}$  de ABA, em três das quatro linhagens analisadas, embora não diferenciado estatisticamente, observou-se que quanto menor a concentração de ABA, há uma tendência de aumentar o número de embriões somáticos maduros (NUNES et al., 2017). A concentração de 120  $\mu\text{M}$  de ABA foi a mais eficiente na obtenção de embriões em *P. caribaea* var. *hondurensis* (ZANELLA, 2016), em *P. strobus* (KLIMASZEWSKA; SMITH, 1997) e em *P. pinaster* (MIGUEL et al., 2004). Para as linhagens testadas no presente trabalho, as concentrações de ABA de 40  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$  e 120  $\mu\text{M}$  não foram observadas a formação de embriões somáticos.

### 3.4 TESTES HISTOQUÍMICOS

As principais substâncias de reservas em sementes são carboidratos, proteínas e lipídios (TOZZI, TAKAKY, 2011). Ao acumular essas substâncias, estas serão fontes de energia para as primeiras etapas do desenvolvimento da planta até que a planta comece a sintetizar essas substâncias após a germinação, ou conversão, sendo a concentração destas um indicador importante para o processo de embriogênese somática (MERKLE et al., 1995; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2009). Analisando a massa embriogênica de PCH x PEE observou-se o acúmulo dessas substâncias, carboidratos, proteínas e lipídios, principalmente nas células embriogênicas (FIGURA 5):

FIGURA 5 – Colorações histoquímicas em células embriogênicas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliottii* var. *elliottii*, para polissacarídeos, amido, proteínas e lipídios. Colombo – PR.



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: Seta vermelha – células embriogênicas, Seta azul – células do suspensor. A e B – Polissacarídeos em massa embriogênica coradas com a reação de Periodic Acid Schiff (PAS) (seta amarela indicando a presença de polissacarídeos); C e D – Grãos de amido em massa embriogênica coradas com lugol (seta amarela indicando grânulos de amidos); E e F – Corpos proteicos em massa embriogênica coradas com Azul de Coomassie (seta amarela indicando corpos proteicos); G e H – Corpos lipídicos em massa embriogênica corados com Sudan III (seta amarela indicando corpos lipídicos).

Carboidratos são importantes fontes de energia e de constituição, atuando em processos bioquímicos, agentes osmóticos e fornecedores de carbono. Polissacarídeos foram observados em maior concentração em células embriogênicas desse trabalho (FIGURA 5 – A e B). Uma forma de armazenar esses carboidratos é a formação de grânulos de amido (estruturas de reserva) que foram detectadas com solução de lugol. Grânulos de amido foram encontradas neste trabalho em células pró-embriogênicas, evidenciando o acúmulo de amido (FIGURA 5 – C e D). O amido é considerado uma fonte primária de energia para o crescimento e proliferação celular, fornecendo energia para o desenvolvimento de embriões somáticos (STAMP, 1987; MARTIN et al., 2000). Em *P. pinaster* foi observado um acúmulo maior de amido nas células embriogênicas e poucos grânulos nas células suspensoras, em embriões somáticos de *P. caribaea* var. *hondurensis* foi observado esse acúmulo na extremidade apical, o que corroboram com esse trabalho (TERESO et al., 2007; ZANELLA, 2016).

Em sementes, as proteínas têm função de armazenamento, fornecendo elementos como nitrogênio e enxofre, que são essenciais na síntese de proteínas, ácidos nucléicos e compostos secundários na plântula em crescimento (BUCKERIDGE et al. 2004). Corpos protéicos foram observados em massa embriogênica deste trabalho, com maior concentração nas células de proembriões (células globulares) e na membrana nuclear lipoprotéica (FIGURA 5 – E e F). Em embriões somáticos, os corpos protéicos apareceram na parte apical do caule e da raiz do embrião de *P. pinaster* e de *P. caribaea* var. *hondurensis* (TERESO et al., 2007, ZANELLA, 2016).

Os lipídios ocorrem em plantas, na maior concentração em sementes, frutos e folhas, além de serem uma importante forma de armazenar carbono em sementes (VOELKER, KINNEY 2001). Corpos lipídicos também foram encontrados em massa embriogênica do pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), palmeira guariroba (*Syagrus oleracea* Becc.) e mamoeiro (*Carica papaya* L.) (DIAS, 2016; CARDOSO, 2018; KOEHLER, 2004). Juntamente com proteínas, exercem papel fundamental na composição das membranas celulares. Corpos lipídicos reagiram positivamente ao vermelho de Sudan III em massas embriogênicas desse trabalho e na membrana nuclear lipoproteica (FIGURA 5 – G e H).

### 3.5 CRIOPRESERVAÇÃO

#### 3.5.1 Efeito da concentração da solução crioprotetora a 5 e 7,5% de PSD (20% PEG 4000; 20% Sacarose e 20% DMSO), lavagem do crioprotetor do tecido embriogênico e criopreservação

Em relação à concentração do crioprotetor, criopreservação e posterior lavagem do crioprotetor, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos aplicados (TABELA 4). O controle (crescimento das massas em meio de proliferação) apresentou taxa de crescimento de  $253,39 \pm 47,5\%$ , enquanto os demais tratamentos não foram utilizados na estatística por falta de repetições biológicas, perdidas devido à contaminação.

TABELA 4 – Efeito da concentração de PSD, lavagem do crioprotetor e criopreservação na taxa de crescimento das massas embriogênicas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliottii* var. *elliottii* aos 30 dias. Colombo – PR.

Lavagem	Criopreservação	Concentração de PSD	n	% de crescimento
Sem	Sem	7,5%	3	$88,13 \pm 108,6$ a
	Sem	5,0%	3	$8,86 \pm 5,5$ a
Com	Sem	7,5%	3	$8,08 \pm 7,6$ a
	Com	5,0%	2	$0,66 \pm 2,8$ a

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: As variâncias foram homogêneas pelo teste de Bartlett. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Quando analisadas duas linhagens, comparando a concentração do crioprotetor com a criopreservação também não foi observada diferença significativa, mas sim diferença em relação ao tratamento sem criopreservação para a linhagem LNJA07, na presença do crioprotetor PSD a 7,5% (TABELA 5). Os demais tratamentos não foram utilizados na estatística por falta de repetições biológicas, perdidas por contaminação.

TABELA 5 – Efeito da concentração do crioprotetor PSD e criopreservação na taxa de crescimento das massas embriogênicas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliottii* var. *elliottii* aos 30 dias. Colombo – PR.

Linagem	Criopreservação	Concentração de PSD	n	% de crescimento
LNJA07	Sem	7,5%	3	116,83 ± 21,6 a .
	Com	5,0%	3	12,81 ± 3,0 b
	Com	7,5%	2	14,45 ± 16,4 b
LNJA02	Com	7,5%	2	20,80 ± 2,6 b

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: As variâncias foram homogêneas pelo teste de Bartlett. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Conforme esperado, a criopreservação a temperatura ultrabaixa teve efeito negativo sobre o crescimento das massas, quando comparada aos tratamentos onde não houve exposição ao nitrogênio líquido. Na criopreservação o material vegetal pode ser conservado devido a temperatura ultrabaixa (-196 °C) em nitrogênio líquido no qual os explantes são mantidos. Nessa condição, a atividade celular diminui e a degradação de organelas é paralisada, fazendo com que o explante seja armazenado teoricamente por tempo indeterminado (ENGELMANN, 2004). No entanto, mesmo com esse efeito houve um crescimento das massas embriogênicas, demonstrando que permaneciam viáveis após o procedimento. Não houve diferença entre as duas concentrações de PSD testadas, portanto o protocolo utilizando o crioprotetor PSD pode ser considerado viável nas concentrações de 5 e 7,5%.

Em outro estudo, quando utilizada a solução de PSD (20% PEG 4000; 20% Sacarose e 20% DMSO) (5%), obteve-se uma maior porcentagem de taxa de sobrevivência em massas embriogênicas de *P. elliottii* x *P. caribaea* var *hondurensis* quando comparado a utilização apenas do DMSO (5%) (NUNES et al., 2017b). Quando sementes de *Passiflora nítida* foram tratadas com DMSO (0,72; 1,04 e 1,35 mol), a germinação e o índice de velocidade de germinação foram afetados negativamente, quando comparados aos tratamentos com solução de sacarose a 0,37; 0,46; 0,54 e 0,61 mol (FARIA et al, 2020). Sementes de *Passiflora edulis* tratadas com DMSO 7% apresentaram menor porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação quando comparadas ao tratamento com solução de sacarose (0,3 M) e sem o uso de crioprotetores (ARAÚJO et al., 2016). Já para

protocormos de *Cattleya granulosa* Lindl. os tratamentos contendo DMSO, garantiram a maior porcentagem de sobrevivência (57 e 62%) após a criopresevação, quando comparados a utilização de glicerol (2 M), sacarose (0,4 M) e os dois associados (SUZUKI et al., 2018).

Para que o explante seja submetido a baixíssimas temperaturas é necessário realizar procedimentos utilizando soluções crioprotetoras que impeçam a formação de cristais de gelo que perfurem a membrana celular, causando a morte do explante. Esses crioprotetores, são classificados de duas maneiras: os penetrantes e os não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes são moléculas de baixo peso molecular capazes de atravessar a membrana plasmática e atuar no ajustamento do balanço osmótico em substituição da água removida do meio intracelular, possibilitando que a célula alcance o estado vítreo durante o congelamento. Nesta classe estão o glicerol, etilenoglicol, propilenogliicol e dimetilsulfóxido (DMSO), (BENSON et al., 2012). Já os crioprotetores não penetrantes induzem a desidratação devido ao aumento da osmolaridade extracelular, removendo o excesso de água intracelular por fluxo osmótico e algumas substâncias são: açúcares, como sorbitol, trealose, e sacarose, polivinilpirrolidona (PVP), o óxido de polietileno e o hidroxietilamido (DUMET et al., 1993).

Apesar dos crioprotetores serem essenciais para o congelamento seguro da maioria dos sistemas biológicos, essas substâncias não permitem a sobrevivência de todas as células, o que pode ser explicado por apresentarem efeitos tóxicos que dependem principalmente da concentração do crioprotetor utilizado bem como do tempo de exposição da célula ao mesmo (OLIVEIRA, 2003). O DMSO devido a sua alta solubilidade em água, apresenta como inconveniente a capacidade de causar alterações à membrana celular, as quais danificam e inviabilizam as células. E, assim, mesmo em concentrações muito baixas, pode ser tóxico a alguns sistemas biológicos, principalmente quando mantidos por longo período em temperaturas acima de 5 °C (HUBÁLEK, 2003). No presente estudo, apesar de não ter sido comparado estatisticamente, o controle sem o tratamento teve praticamente o dobro do crescimento de massas tratadas apenas com a solução, sem o tratamento de criopresevação, sugerindo que o crioprotetor teve efeito deletério sobre o crescimento das massas, que pode ter sido causado pela presença de DMSO na solução.

### 3.5.2 Efeito do tempo do tecido embriogênico na presença do crioprotetor PVS3 (glicerol 40% (v/v) e sacarose 40% (v/v)) e criopreservação do tecido embriogênico

Com a finalidade de evitar o uso de DMSO, em razão da possível toxicidade celular (HUBÁLEK, 2003), a utilização de “*Plant vitrification solution 3*” ou PVS III, que é composta por 40% (v/v) de glicerol e 40% (v/v) de sacarose foi avaliada como uma alternativa na crioproteção das massas (URAGAMI et al., 1989).

Para avaliar qual o melhor tempo de exposição do crioprotetor PVS3 em contato com a massa embriogênica e o efeito da criopreservação na taxa de crescimento, foi realizado esse experimento. Quando submetido ao processo de criopreservação, aos 30 dias foi observada diferença apenas para 180 min, que, no entanto, não diferiu de 120 min. No entanto, após 90 dias, não houve diferença entre os tratamentos com criopreservação. Os tratamentos T06 e T07 não foram utilizados na estatística por falta de repetições, perdidas por contaminação (TABELA 6).

TABELA 6 – Efeito de diferentes tempos de exposição ao crioprotetor PVS3 e da criopreservação de massas embriogênicas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliottii* var. *elliottii* aos 30 e 90 dias. Colombo – PR.

Tratamento	Criopreservação	Tempo de contato com o PVS3 (min)	n	% de crescimento 30 dias	% de crescimento 90 dias
T01	Sem	0	5	-6,64 ± 9,4 c	1331,2 ± 281,8 b
T02		60	3	7,62 ± 7,1 a b c	1371,9 ± 474,9 a b
T03		120	5	-5,16 ± 9,2 b c	1061,3 ± 286,1 b
T04		180	4	2,60 ± 5,5 a b c	1577,9 ± 691,4 a b
T05		240	5	-2,46 ± 11,1 b c	1656,6 ± 1007,9 a b
T08	Com	120	4	12,58 ± 8,6 a b .	1508,2 ± 635,0 a b
T09		180	4	20,44 ± 8,5 a .	2698,3 ± 426,7 a .
T10		240	5	-0,54 ± 3,4 b c	1786,7 ± 488,3 a b

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: As variâncias foram homogêneas pelo teste de Bartlett. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Aos 30 dias foram observadas taxas de crescimento negativo, podendo ser relacionada a toxicidade dos crioprotetores para as células, causando um menor desenvolvimento e um atraso para a proliferação das massas embriogênicas. A taxa de crescimento foi lenta para alguns tratamentos sem a criopreservação. No entanto, após 90 dias houve crescimento em todos os tratamentos, mostrando que apesar do atraso inicial, em todos os tratamentos as células estavam vivas após o tratamento com o crioprotetor.

O tratamento com criopreservação aos 30 dias, com tempo de exposição ao crioprotetor de 180 min, diferiu estatisticamente dos tratamentos com tempo de exposição de 0, 120 e 240 min, sem criopreservação, e de 240 min com criopreservação. Aos 90 dias, o tratamento com criopreservação, com 180 min, diferiu dos tratamentos com 0 e 120 min sem criopreservação.

Em células somáticas de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) submetidas ao tratamento com PVS3 com ou sem a criopreservação, os tratamentos de 120 e 180 min apresentaram maior taxa de crescimento (52,4 e 42,9%, respectivamente) após 12 semanas (HERINGER, 2013). Em embriões zigóticos de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) quando submetidos a criopreservação com PVS3, por 90 e 120 min apresentam melhor porcentagens de crescimento, quando não criopreservados, e não houve diferença na taxa de crescimento em relação ao tempo de exposição (0, 30, 60, 90 e 120 min) (NAKKANONG, NUALSRI, 2018).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado na criopreservação sendo na década de 1950 utilizado puro ou na concentração de 50% para a preservação de bactérias e vírus em temperaturas entre -4 e -20 °C (HUBÁLEK, 2003). A sacarose como agente osmoprotetor, pode auxiliar na estabilização das membranas, além de atuar como fonte de carbono e energia, regulador do potencial osmótico das células, sinalizador de processos biológicos, substrato para síntese de enzimas que participam no processo germinativo da semente, regulador de morfogênese entre outros, limitando os danos causados pela dessecação (BUCKERIDGE et al. 2000).

Dentre os dois crioprotetores utilizados na criopreservação de massas embriogênicas neste trabalho, não foi observado aos 30 dias, efeito deletério do uso do DMSO, onde as massas apresentaram taxas de crescimento similares (PSD 12,81%; 14,45% e 20,80% (TABELA 5), e PVS3 12,58% e 20,44% (TABELA 6), sugerindo que ambos os protocolos podem ser utilizados para as massas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliotii* var. *elliottii*. Estes resultados, embora não

avaliados no mesmo experimento, divergem dos apresentados por Suzuki et al (2018), no qual protocolamos de *Cattleya granulosa* Lindl quando tratadas com glicerol (2M), sacarose (0,4 M) e com ambas as soluções em conjunto, apresentaram menor porcentagem de sobrevivência aos 60 dias, menor massa seca (mg) e menor altura (cm) aos 180 dias, quando comparados a tratamentos com o uso de DMSO (SUZUKI et al., 2018).

Com base nos dados apresentados, levando em consideração a execução do protocolo, a segurança individual e coletiva, e os custos envolvidos no processo, o protocolo utilizando o crioprotetor PVS3 seria o mais indicado para a criopreservação das massas embriogênicas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliottii* var. *elliottii*.

### 3.6 EFEITO DA AÇÃO DO CLAVULIN® E DO PPM™ NO CRESCIMENTO DO TECIDO EMBRIOGÊNICO

Foi observado após o processo de criopreservação a formação de colônias de bactérias, comprovada pela sua morfologia, odor, coloração e teste de Gram, no aglomerado de células embriogênicas. Como resultado, embora não significativamente, uma menor porcentagem de contaminação do tecido embriogênico foi obtido quando utilizado o PPM™. No tratamento contendo o Clavulin® foi observado o surgimento de colônias de bactérias, além do surgimento de fungos no tratamento controle. Para o tratamento com o PPM™ não foi observado a formação de colônias de microrganismos (TABELA 7).

TABELA 7 – Efeito do uso de antibiótico no meio de cultura e sua influência na taxa de crescimento das massas embriogênicas e como controle de contaminação.

Tratamentos	n	% de crescimento*	Contaminação**	
			Fungos	Bactérias
Controle	3	67,09 ± 23,7 a	+	-
Clavulin®	3	55,77 ± 9,0 a	-	+
PPM™	3	44,93 ± 13,7 a	-	-

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: \* As variâncias foram homogêneas pelo teste de Bartlett. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. \*\* (+) presença, (-) ausência.

A contaminação no meio de cultura pode se manifestar de várias formas, pelo explante, do meio nutritivo, do ambiente e do operador (SOUSA et al., 2007). Para evitar essa contaminação é realizado uma desinfestação superficial de explantes, em que geralmente são utilizados o etanol em concentrações entre 70% e 80% e o hipoclorito de sódio ou de cálcio, nas concentrações de 0,5 a 2% de cloro ativo (GRATTAPALIA; MACHADO, 1998).

A presença de microrganismos endofíticos é uma das mais importantes causas de perda de material vegetal, por contaminação. As contaminações bacterianas podem ter o seu desenvolvimento retardado, ocasionando um problema sério quando detectadas somente na fase de multiplicação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Bactérias endofíticas podem competir nutrientes com os explantes, além de acidificar o meio de cultura, afetando o desenvolvimento *in vitro* dos explantes (CASSELLS, 2001). Quando há estresse no explante, os microrganismos endofíticos encontram condições favoráveis para seu desenvolvimento no meio de cultura, causando a contaminação (PEIXOTO NETO et al., 2003). Para controlar essa contaminação, o uso de antibióticos é uma alternativa para evitar a perda do material *in vitro* (GRATTAPAGLIA, MACHADO, 1998).

## 4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Para o híbrido *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* a resposta a indução da embriogênese teve influência do genótipo.
- As condições testadas neste trabalho não foram eficientes para a maturação de embriões somáticos, não sendo observado a formação de embriões somáticos.
- Foi possível avaliar a capacidade embriogênica e o acúmulo de substâncias de reserva nas amostras por meio das análises histoquímicas.
- Para criopreservação, os crioprotetores PSD e PVS3, apresentaram taxas de crescimento similares, sugerindo que ambos os protocolos podem ser utilizados para massas embriogênicas do híbrido.
- A utilização do crioprotetor PVS3, com tempo de exposição de 180 min, apresenta a maior taxa de crescimento aos 30 e 90 dias, quando comparado aos outros tratamentos.
- O uso de antibióticos no meio de cultura não afeta a proliferação das massas embriogênicas.

**CAPÍTULO 2 – PATOGENICIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM  
SEMENTES IMATURAS DO HÍBRIDO *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea*  
var. *hondurensis* EM SEMENTES, PLÂNTULAS E MUDAS.**

## RESUMO

Microrganismos endofíticos, vêm sendo estudados na busca de novas espécies e pela sua importância nas aplicações biotecnológicas. Estes também podem se apresentar como fitopatógenos quando surgem condições favoráveis para o seu desenvolvimento sobre a planta hospedeira. A detecção de microrganismos endofíticos presentes em sementes florestais é de grande importância, para evitar o fluxo de microrganismos que possam ser patogênicos em uma dada cultura. Este trabalho teve como objetivo, avaliar a patogenicidade de fungos endofíticos de sementes imaturas de *Pinus elliotii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* em sementes maduras, plântulas *in vitro* e mudas. Para o isolamento, parte do micélio do fungo surgido em cultivo de embriões foi transferido para meio BDA, seguindo o processo de purificação e de produção de culturas monospóricas. A caracterização dos isolados foi realizada por análises morfológicas e por sequenciamento genético. Para a verificação da patogenicidade, os isolados foram testados via sementes, em plântulas *in vitro* e em mudas de *Pinus elliotii* var. *elliottii*. Sete isolados foram obtidos, sendo dois do gênero *Fusarium*, três da espécie *Sporothrix pallida* e dois da espécie *Diplodia pinea*. Os isolados de *Fusarium* e de *D. pinea* foram patogênicos em sementes, plântulas *in vitro* e em mudas de *Pinus elliotii* var. *elliottii*, mostrando sintomas de tombamento e de queima de ponteiros. Para *S. pallida*, é o primeiro relato da presença da espécie em sementes de *Pinus*, e os isolados não apresentaram patogenicidade nos experimentos realizados.

Palavras-chave: *Fusarium*. *Diplodia pinea*. *Sporothrix pallida*. Patologia de sementes. Queima de ponteiros.

## ABSTRACT

Endophytic microorganisms have been studied in the search for new species due to their importance in biotechnological applications. However, these organisms can also be phytopathogens when favorable conditions arise for their development on the host plant. The characterization of endophytic microorganisms living inside the seeds is of great importance, once they can avoid the flow of microorganisms that may be pathogenic to a given culture. This work aimed to evaluate the pathogenicity of endophytic fungi isolated from immature seeds of *Pinus elliotii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* and inoculated on mature seeds, *in vitro* seedlings and seedlings of *Pinus elliotii* var. *elliottii*. For isolation, a sample of the mycelium that emerged from embryos cultivated *in vitro* was isolated and inoculated on PDA medium. From this culture, the process of purification was carried out, followed by the production of monosporic cultures. The characterization of the isolates by morphological analysis and by genetic sequencing performed. To evaluate the pathogenicity, the isolates were inoculated on seeds, *in vitro* seedlings and seedlings of *Pinus elliotii* var. *elliottii*. Seven isolates were obtained, among them two *Fusarium*, three *Sporothrix pallida* and two *Diplodia pinea*. *Fusarium* and *D. pinea* isolates were pathogenic for seeds, *in vitro* seedlings and seedlings of *Pinus elliotii* var. *elliottii*, which showed symptoms of tipping and burning of the tops. This is the first report of the presence of *S. pallida* in *Pinus* seeds, and the isolates did not show pathogenicity for *Pinus elliotii* var. *elliottii*.

Keywords: *Fusarium*. *Diplodia pinea*. *Sporothrix pallida*. Seed Pathology. Shoot blight

## 1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos endofíticos, pertencem em sua maioria, aos fungos e bactérias, os quais habitam o interior dos órgãos e tecidos vegetais, sem causar danos aparentes (DUTTA et al., 2014). São encontrados nos mais diversos segmentos da planta, como folhas, caules, raízes, (FELBER et al., 2016) estruturas florais (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011) e em sementes (ALVES et al., 2020).

Essas associações planta-hospedeiro podem ser benéficas, quando o endofítico pode atuar como promotor de crescimento vegetal (GUNDEL et al., 2010) e como proteção a fitopatógenos (JIA et al., 2016). A forma de transmissão dos endofíticos, podem ocorrer de forma horizontal, por meio dos estômatos, raízes ou, até mesmo, por ferimentos, ou ainda, de forma vertical, por meio de sementes (ALY et al., 2011). Dependendo do formato de interação do microrganismo endofítico com a planta hospedeira, a idade do vegetal e sob condições ambientais propícias, o microrganismo deixa o seu estado latente e pode desenvolver uma função patogênica, causando danos a planta hospedeira (ALY et al., 2010).

Dentre os principais fitopatógenos associados ao *Pinus* estão os fungos *Fusarium* spp. (CARMO, 2017) e *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx f. (sin. *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton.) segundo Basilio (2013).

Esporos de *Fusarium* spp. e de *D. pinea* podem estar presentes internamente nas sementes de *Pinus*, e estes quando germinam, colonizam as sementes e ocasionam sintomas nas plântulas (HOMECHIN et al., 1986; SANTOS et al., 2011; SMITH et al., 1996, 2000). Os esporos dos fungos podem ser encapsulados durante a formação das sementes de pínus, permanecendo dormentes até a germinação (AUER, 1993). Em *P. patula* e *P. radiata* com três anos de idade, *D. pinea* esteve presente como infecção latente em cones maduros (SMITH et al., 2000).

O gênero *Fusarium* quando associado a sementes, tem causado tombamento em plântulas em pré e pós-emergência (SILVA et al, 2017). Essa associação foi descrita para aproximadamente 100 espécies florestais (SANTOS, REGO, 2011). O fungo *D. pinea*, quando associado a semente causa redução na germinação, má formação das radículas, a queima e tombamento dos ponteiros das mudas (REES; WEBBER, 1988; STANOSZ et al., 1997). Este fungo também provoca a seca de ponteiros em mudas e plantas adultas (CORRÊA et al, 2012).

O fungo *D. pinea* como endófito, foi dispersado pelo mundo, através das introduções de mudas de pínus. Fundamentado nessa hipótese, a introdução do patógeno no Brasil ocorreu por meio de mudas com endofíticos latentes, durante as primeiras introduções de *Pinus* (BURGESS et al. 2004). Por essa razão, faz-se necessária uma maior atenção e cuidados para que patógenos não sejam introduzidos em território brasileiro e disseminados, principalmente por meio de sementes contaminadas (AUER, SANTOS, 2011).

A detecção de patógenos presentes em sementes florestais é de grande importância, pois permite obter informações que irão auxiliar no seu controle (SANTOS et al., 2011). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de fungos endofíticos, originados de sementes imaturas de *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* em sementes maduras, plântulas *in vitro* e mudas de *Pinus elliotii* var. *elliotii*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de caracterização da patogenicidade foram conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal, da Embrapa Florestas, Colombo – PR, e na estufa do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

### 2.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Os fungos foram obtidos a partir do experimento de embriogênese somática utilizando megagametófitos imaturos do *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*, em meio de cultura, onde apareceram como endofíticos, realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação, da Embrapa Florestas.

Estes megagametófitos imaturos com fungos foram transferidos para o Laboratório de Patologia Florestal, onde foi realizado o isolamento, retirando parte do micélio e transferindo para uma placa contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) (39 g do extrato comercial Kasvi® para 1.000 mL de água ultrapurificada). O material foi incubado em câmara BOD, a 24 °C, por sete dias, sendo realizado a repicagem a cada duas semanas, dos sete isolados obtidos.

Para a realização dos experimentos foram utilizados sete isolados: os isolados esporulantes FUJA01, FUJA04, FUJA07 e FUJA08 e os isolados FUJA02, FUJA05 e FUJA06 que não esporularam em meio de cultura BDA.

Os isolados FUJA01, FUJA02, FUJA04, FUJA05, FUJA06, FUJA07 e FUJA08 foram preservados pelo método de Castellani (FIGUEIREDO, 2001), em triplicatas em frascos de vidro penicilina de 10 mL com água esterilizada. Estes isolados estão depositados na Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais do Laboratório de Patologia Florestal, Embrapa Florestas.

#### 2.1.1 Obtenção das culturas monospóricas

Para esta atividade, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Jarek (2018), utilizando um disco de micélio de 5 mm de diâmetro retirado da colônia dos isolados

de *Fusarium* spp. (FUJA01 e FUJA04), previamente cultivados em meio BDA, incubados em câmara BOD, a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias.

Este micélio foi transferido para tubo de ensaio contendo 10 mL de água ultrapurificada esterilizada, sendo realizada a agitação manual para a liberação dos esporos. Após essa agitação, foi realizada uma diluição em série até a obtenção de uma concentração de  $10^{-4}$  esporos mL<sup>-1</sup>. Ao fim das diluições, foram pipetadas 50 gotas de 5 µL de cada suspensão, e depositadas sobre o fundo de uma placa de Petri de PVC esteril, com 90 mm de diâmetro (JProlab®). A placa foi invertida e ficou em repouso por 60 min, para que com a ação da gravidade, os esporos se depositassem na parte inferior da gota (JAREK, 2018).

Posteriormente, a placa foi observada em microscópio, com aumento de 100x, e a gota que apresentava apenas um esporo, foi novamente pipetada e transferida para uma placa contendo meio ágar-água (AA) (20 g de ágar em 1.000 mL de água ultrapurificada). A placa foi incubada em câmara BOD a 24 °C com fotoperíodo de 12 h, por 24 h. Após esse período, a placa foi observada em microscópio, e o esporo que germinou, foi transferido para uma nova placa de Petri contendo meio BDA (JAREK, 2018).

Para os isolados de *D. pinea* (FUJA07 e FUJA08), estes foram previamente cultivados em meio de ágar-água-acícula de pínus (AAA) (DE WET et al., 2003), por 21 dias, até a formação dos picnídios. Os picnídios foram coletados com bisturi, e colocados em tubos Eppendorf e adicionados 1 mL de água ultrapurificada e autoclavada, realizando a maceração dos picnídios com a ponta do bisturi, e levados ao Vortex por 2 min. Como esse material apresentava uma quantidade muito inferior de esporos, foi pipetada uma alíquota de 100 µL, depositada em placa de Petri contendo o meio AA, e espalhado usando uma alça de Drigalski (BASILIO, 2013).

A placa foi incubada em câmara BOD a 24 °C por 24 h, e em seguida, levada ao microscópio, e o esporo germinado foi transferido para uma nova placa de Petri com meio BDA.

### **2.1.2 Identificação morfológica e molecular dos isolados**

Para a identificação morfológica, as placas de Petri contendo meio BDA foram observadas quanto ao crescimento, a coloração e o aspecto da cultura. Destas placas, foram confeccionadas lâminas de cada isolado, retirando uma porção do micélio do

fungo, corando com lactoglicerol azul de algodão, e visualizado em microscópio ótico, com objetivas de 4x, 10x e 40x. A identificação dos fungos, em nível de gênero, foi realizada conforme descrição de Barnett e Hunter (1972).

Para os isolados FUJA07 e FUJA08, foi utilizado o trabalho de Basílio (2013) para identificação ao nível de espécie, analisando a caracterização morfológica da cultura, a presença de picnídios e o formato e coloração dos esporos.

Para a identificação molecular, os isolados foram repicados em meio BDA. Após 14 dias, cinco amostras foram submetidas à extração e sequenciamento de DNA. Tais procedimentos foram executados pela empresa de biotecnologia especializada em sequenciamento GoGenetic, incubada na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), utilizando os protocolos descritos na sequência:

A extração do DNA dos isolados foi obtida nas culturas dos isolados FUJA01, FUJA02, FUJA04, FUJA05 e FUJA06 crescidas em placas de Petri contendo meio BDA por um período de 14 dias. Aproximadamente 150 mg de micélio foram utilizadas para extração de DNA com o kit *Wizard Magnetic DNA Purification System* (Promega, Madison, EUA), conforme recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado e avaliado quanto à pureza em *Nanodrop2000* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

A amplificação das amostras de DNA genômico foi realizada em termociclador Veriti (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), em reação contendo 20 ng de DNA genômico purificado. Para a amplificação da região ITS utilizou-se os *primers* ITS1(5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG '3) e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC '3), foram utilizados 32 ciclos de desnaturação (96 °C por 30 s), anelamento do *primers* (58 °C por 45 s) e extensão do produto (72 °C por 45 s).

Os produtos do DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE). As reações foram purificadas com ExoI/SAP (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA), conforme recomendação do fabricante.

As amostras foram sequenciadas em *Genetic Analyser 3500xL* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA), utilizando capilares de 50 cm com polímero Pop7 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA), conforme orientações do fabricante. Os eletroforetogramas gerados foram convertidos em sequência de bases com o programa *Sequencing Analysis v5.4* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA).

As sequências obtidas foram comparadas com acessos depositados no GenBank utilizando-se o "Nucleotide BLAST" no servidor do NCBI para identificação.

## 2.2 SEMENTES E MUDAS PARA OS TESTES DE PATOGENICIDADE

As sementes e as mudas de *P. elliotii* var. *elliotii* utilizadas nesse trabalho, foram adquiridas do Viveiro Florestal D'Agostin, Colombo-PR. As mudas foram produzidas, utilizando substrato comercial de casca de pínus e vermiculita mais adubo, em tubetes de 55 cm<sup>3</sup>, com três meses de idade e com altura média de 15 cm. As sementes utilizadas foram procedentes de pomar clonal de sementes (PCS) de 2ª geração (WestRock, Três Barras-SC).

## 2.3 TESTE DE PATOGENICIDADE EM PLÂNTULAS *in vitro*

No experimento *in vitro*, foram utilizadas plântulas de *P. elliotii* var. *elliotii*. Para a obtenção de plântulas, as sementes foram imersas em água da torneira por 24 h. Após esse período, as sementes foram imersas em solução aquosa de peróxido de hidrogênio (40 volumes), em frasco fechado, e ficaram sob agitação em *shaker*, a 100 rpm, por 60 min, no escuro (QUISEN; DEGENHARDT-GOLDBACH, 2020). Em seguida, foi realizada a lavagem em água ultrapurificada esterilizada, até que não se observasse a formação de bolhas nas sementes.

As sementes foram dispostas para germinar em placa de Petri de vidro, contendo uma dupla camada de papel filtro, de 90 mm (JProlab®), esterilizado, com 2 mL de água ultrapurificada esterilizada. Cada placa continha dez sementes espalhadas equidistantes. As placas contendo as sementes foram incubadas em sala asséptica de vegetação a 25 °C, com fotoperíodo de 16 h, e sendo adicionada água ultrapurificada esterilizada a cada 4 dias.

### 2.3.1 Montagem do Experimento

Após a germinação das sementes *in vitro* nas placas de Petri, as plântulas foram transferidas para frascos de vidro de 240 mL, contendo 50 mL de meio de cultura WV5 (COKE, 1996) suplementado com 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 5 g L<sup>-1</sup> de ágar. Foram utilizados os isolados FUJA04, FUJA06 e FUJA07, compondo quatro tratamentos: TP01 (Controle), TP02, TP03 e TP04, respectivamente, com nove repetições, com quatro plântulas por frasco, dispostas equidistantes, totalizando 36 frascos.

No centro de cada frasco, foi introduzido um disco com quatro milímetros de diâmetro de meio BDA com o micélio do fungo (ou apenas meio BDA, no Controle), para cada tratamento correspondente. O experimento foi avaliado semanalmente, anotando-se o aparecimento de sintomas, como tombamento, queima do ponteiro, necrose e morte. Para avaliar a patogenicidade, foi utilizada uma escala de notas que variaram de 1 a 3, onde o valor 1 = plântula sem sintomas; valor 2 = plântula com tombamento ou seca de ponteiro; e o valor 3 = plântula morta.

Para as plântulas que apresentaram sintomas, foi realizado o procedimento de reisolamento do fungo para a confirmação dos postulados de Koch.

### 2.3.2 Reisolamento

Para o reisolamento, foi realizada a coleta da plântula com sintomas. Esta foi seccionada com cerca de 1 cm, da região da lesão, que passou pelo processo de assepsia, pela mergulhia em álcool 70% por 30 s, em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 min, e tríplice lavagem em água ultrapurificada esterilizada. Em seguida, a secção foi colocada em placa de Petri, de 60 mm, contendo meio BDA, e incubado em câmara BOD a 24 °C, sem fotoperíodo.

Após sete dias, avaliou-se a morfologia da cultura, e o material em lâmina para observação dos esporos e das estruturas fúngicas no microscópio, para confirmação do fungo inoculado.

## 2.4 TESTE DE PATOGENICIDADE EM SEMENTES DE *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

Para o teste de patogenicidade em sementes foram usados os sete isolados, que foram repicados para placas de Petri, contendo meio BDA e incubados em câmara BOD, a 24 °C, por 7 e 14 dias, com fotoperíodo de 12 h. As sementes de *P. elliottii* var. *elliottii*, foram previamente desinfestadas e quebrada a dormência, em 100 mL de solução aquosa de peróxido de hidrogênio (40 volumes), sob agitação em *shaker*, a 100 rpm, por 60 min, no escuro (QUISEN; DEGENHARDT-GOLDBACH, 2020). Após, foi realizada a lavagem em água ultrapurificada esterilizada, até que não se observasse a formação de bolhas sobre as sementes. Em seguida, as sementes foram inoculadas, colocando-as nas placas em contato com o micélio do fungo, por

48 h. A testemunha consistiu em deixar as sementes em contato com meio BDA sem o fungo (REGO, 2008).

Foram realizados oito tratamentos, sendo o Controle (TS01) e os isolados FUJA01 (TS02), FUJA02 (TS03), FUJA04 (TS04), FUJA05 (TS05), FUJA06 (TS06), FUJA07 (TS07) e FUJA08 (TS08), com três repetições, e dez sementes em cada repetição. Após o período de inoculação, foi realizada a semeadura em bandejas de isopor contendo vermiculita esterilizada, sendo colocada uma semente por célula. As bandejas com as sementes foram mantidas em estufa, com irrigação por nebulização, por 60 dias, contando-se, semanalmente, o número de plântulas emergidas sem sintomas e com sintomas.

#### 2.4.1 Avaliação

A avaliação foi realizada durante a emergência das plântulas, quantificando-se as plântulas sintomáticas, caracterizadas por tombamento de pré e pós-emergência.

As plântulas sintomáticas foram coletadas e, seguiram para isolamento direto e isolamento indireto, dependendo da situação que o material se encontrava. Para o isolamento indireto, as plântulas foram desinfestadas em álcool 70% (v/v) por 30 s, solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 1 min e lavadas em água ultrapurificada esterilizada. Posteriormente, as plântulas foram colocadas em placas de Petri com meio BDA e incubadas em câmara BOD a 24 °C. Para o isolamento direto, as plântulas foram coletadas e colocadas em câmara úmida (caixa tipo 'gerbox' contendo papel 'mata borrão' umedecido em água ultrapurificada e esterilizado) em ambiente de laboratório por sete dias, para a observação da presença de fungos e fechamento dos postulados de Koch.

As sementes não germinadas foram coletadas e colocadas em câmara úmida, para estimular a colonização fúngica e posterior observação das estruturas fúngicas e reisolamento para fechamento do postulado de Koch.

#### 2.5 TESTE DE PATOGENICIDADE EM MUDAS DE *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

Para esse experimento foram realizados nove tratamentos, sendo dois tratamentos de controle, utilizando apenas meio BDA, com inoculação basal (TM01) e outro com inoculação apical (TM07), e sete tratamentos utilizando os isolados

FUJA01(TM02), FUJA02 (TM03), FUJA04 (TM04), FUJA05 (TM05), FUJA06 (TM06), FUJA07 (TM08) e FUJA08 (TM09), sendo realizadas três repetições para cada tratamento e utilizando dez mudas em cada repetição.

A inoculação dos isolados para os tratamentos TM01 a TM06 foi realizada com um ferimento na região basal do caule que consistiu em três cortes paralelos, na horizontal, com uma lâmina de bisturi, e sobre o ferimento, foi inoculado um disco do micélio-ágar em meio BDA (5 mm de diâmetro), e em seguida, a região foi envolta em filme plástico de PVC.

Para os tratamentos TM07 a TM09, foi utilizada uma adaptação da metodologia desenvolvida por Basilio (2013) onde foi realizada a retirada parcial das acículas, de cerca de 2 cm, com o uso de uma tesoura, na região do ponteiro, causando uma injúria, seguida da inoculação de um disco de micélio-ágar em meio BDA (4 mm de diâmetro), na região injuriada. Para a fixação do disco no ferimento, foi utilizada uma fita adesiva envolvendo o disco de micélio e o ponteiro da muda.

As mudas foram mantidas em estufa com irrigação por nebulização, por 160 dias, para manutenção da umidade em todo o período do experimento.

### **2.5.1 Avaliação**

O experimento foi avaliado semanalmente, por 60 dias, e quinzenalmente, até 160 dias da instalação do experimento, para constatar algum sintoma no local das inoculações, como seca de ponteiros e tombamento. Na muda que apresentou seca de ponteiros, foi mensurada a distância da lesão até o ponto de inoculação. Da região da lesão, foi retirado um fragmento de cerca de 2 cm para realizar a assepsia em solução de álcool 70% (v/v) por 30 s, solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 1 min e lavadas em água ultrapurificada esterilizada. Seguiu-se a secção do caule ao meio, para isolar um segmento de cerca de 0,5 cm da faixa de transição da lesão, e na sequência foi transferido em placa de Petri com meio BDA. Os ponteiros das mudas que apresentaram seca de ponteiros e as mudas que apresentaram descoloração das acículas, ficando em tom amarelado, foram colocadas em câmara úmida (gerbox com papel de filtro umedecido com água esterilizada) para a formação de estruturas fúngicas. Posteriormente, fez-se a observação sob microscópio estereoscópio, para a presença de picnídios e conídios de *D. pinea*, ou outra estrutura dos demais fungos inoculados, como conídios de *Fusarium* sp.

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das avaliações foram submetidos à análise de normalidade, de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas por meio do software estatístico ASSISTAT, versão 7.7 beta. (SILVA, 2014)

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS ISOLADOS

Foram obtidos sete isolados fúngicos, cinco isolados foram identificados molecularmente usando a região ITS (isolados FUJA01, FUJA02, FUJA04, FUJA05 e FUJA06), e dois isolados foram identificados apenas morfológicamente (FUJA07 e FUJA08). Da análise molecular, foram identificados dois isolados que correspondem ao gênero *Fusarium* e três da espécie *Sporothrix pallida* (Tubaki) Matsush (TABELA 8). Os isolados do gênero *Fusarium* foram observados em microscópio óptico e foi verificada a presença de conídios. Os dois isolados identificados pela morfologia foram da espécie *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx f. (sin. *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton.) (FIGURA 6).

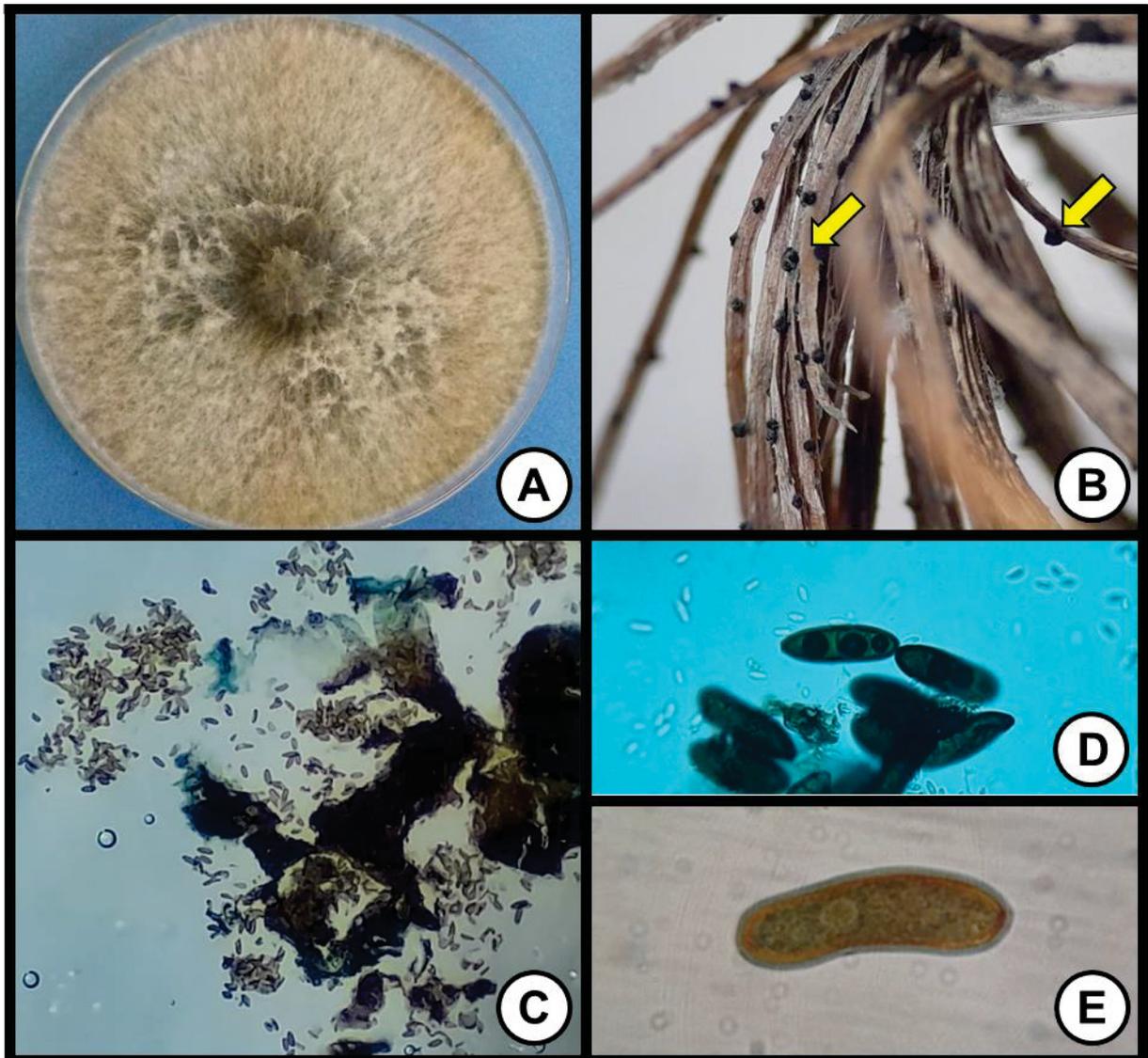
TABELA 8 – Percentual de compatibilidade molecular dos isolados de fungos provenientes de embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliottii* var. *elliottii*. Colombo – PR.

Isolados	Espécie	Compatibilidade (%)
FUJA01	<i>Fusarium</i> sp.	99%
FUJA02	<i>Sporothrix pallida</i>	100%
FUJA04	<i>Fusarium</i> spp.	99,37% (8 spp.)
FUJA05	<i>Sporothrix pallida</i>	100 – 99,81%
FUJA06	<i>Sporothrix pallida</i>	100 – 99,81%

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: Porcentagem de compatibilidade utilizando a plataforma *Blast Search*.

FIGURA 6 – Identificação morfológica de *Diplodia pinea*. Colombo – PR.



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: A – Cultura de *Diplodia pinea* em placa de Petri contendo meio BDA; B – Formação de picnídios em acículas de pinus, C – Lâmina de microscopia com picnídio macerado e esporos (100x); D e E – Esporos de *Diplodia pinea* sob aumentos de 400x e 1000x, respectivamente.

### 3.2 TESTE DE PATOGENICIDADE EM PLÂNTULAS DE *Pinus elliottii* var. *elliottii* *in vitro*

Dos quatro tratamentos, os tratamentos TP02 e TP04 com os isolados de *Fusarium* sp. (FUJA04) (FIGURA 7) e *D. pinea* (FUJA07), respectivamente, apresentaram sintomas, sendo 88,9% de plântulas sintomáticas para o isolado FUJA04 e 97,2% para o isolado FUJA07, apresentando tombamento e seca de

ponteiro, até a morte da plântula. Para o tratamento TP03 com *S. pallida* (FUJA06), as plântulas não apresentaram sintomas (TABELA 9).

Para os isolados *Fusarium* sp. (FUJA04) e *D. pinea* (FUJA07), houve maior agressividade nas plântulas, chegando à mortalidade de 38,9% e de 33,3%.

Foi confirmado pelo reisolamento e pela análise microscópica que *Fusarium* sp. causou os sintomas nas plântulas no tratamento TP02 e *D. pinea*, no tratamento TP04, confirmando a patogenicidade dos dois isolados (TABELA 10).

TABELA 9 – Percentual de plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* com sintomas *in vitro*. Colombo – PR.

<b>Espécie (Isolado)</b>	<b>Sem sintomas (%)</b>	<b>Com sintomas (%)</b>
Controle	100	0
<i>Fusarium</i> sp. (FUJA04)	11,1	88,9
<i>Sporothrix pallida</i> (FUJA06)	100	0
<i>Diplodia pinea</i> (FUJA07)	2,8	97,2

FONTE: O autor (2021)

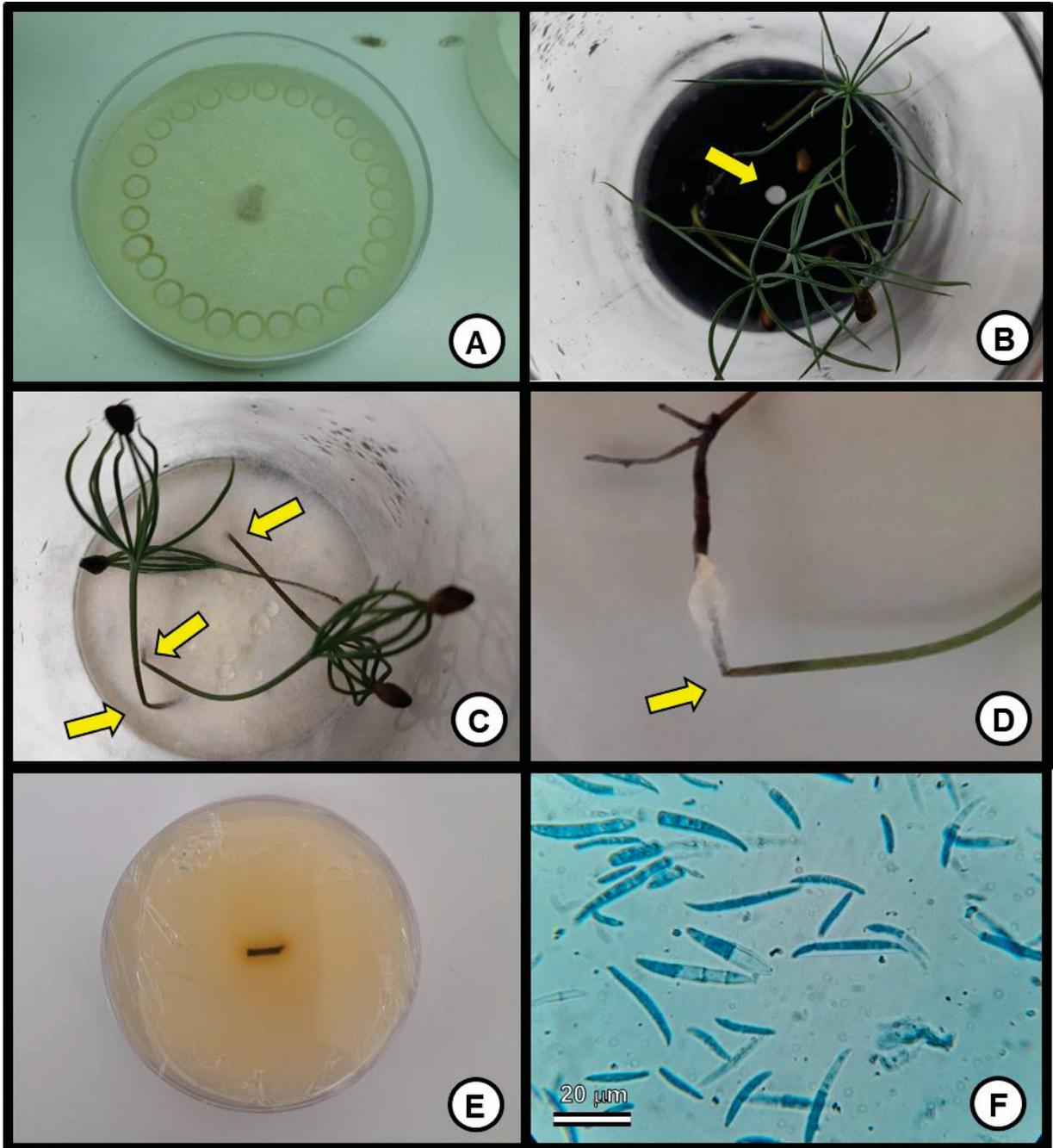
TABELA 10 – Patogenicidade em plântulas, sementes e mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Colombo – PR.

<b>Espécie (Isolado)</b>	<b>Patogenicidade</b>		
	Plântula	Semente	Muda
<i>Fusarium</i> sp. (FUJA01)	Nt	-	-
<i>Sporothrix pallida</i> (FUJA02)	Nt	-	-
<i>Fusarium</i> sp. (FUJA04)	+	+	+
<i>Sporothrix pallida</i> (FUJA05)	Nt	-	-
<i>Sporothrix pallida</i> (FUJA06)	-	-	-
<i>Diplodia pinea</i> (FUJA07)	+	+	+
<i>Diplodia pinea</i> (FUJA08)	Nt	+	+

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: (+) Patogênico; (-) Não patogênico; (Nt) não testado.

FIGURA 7 – Ensaio de patogenicidade com *Fusarium* sp. proveniente de embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliottii* var. *elliottii* em plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* *in vitro*. Colombo – PR.



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: A – Cultura de *Fusarium* sp. em placa de Petri com meio BDA; B – Introdução do disco de micélio-água no centro do frasco (seta amarela) contendo as plântulas; C – Plântulas com sintomas de tombamento (seta amarela); D – Plântula com tombamento, evidenciando a quebra do hipocótilo (seta amarela); E – Reisolamento em placa de Petri com meio BDA; F – Conídios de *Fusarium* sp.

### 3.3 TESTE DE PATOGENICIDADE EM SEMENTES DE *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

Dos oito tratamentos, o tratamento com *Fusarium* sp. (TS04) (FIGURA 8), apresentou a maior porcentagem de sintomas de tombamento em sementes germinadas (23,3%), e os tratamentos com *D. pinea* (TS07 e TS08), apresentaram 6,7% e 3,3% de sintomas, respectivamente (TABELA 11).

TABELA 11 – Percentual de emergência de plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* com e sem sintoma de tombamento e sementes não germinada, aos 60 dias após a inoculação das sementes com os isolados. Colombo – PR.

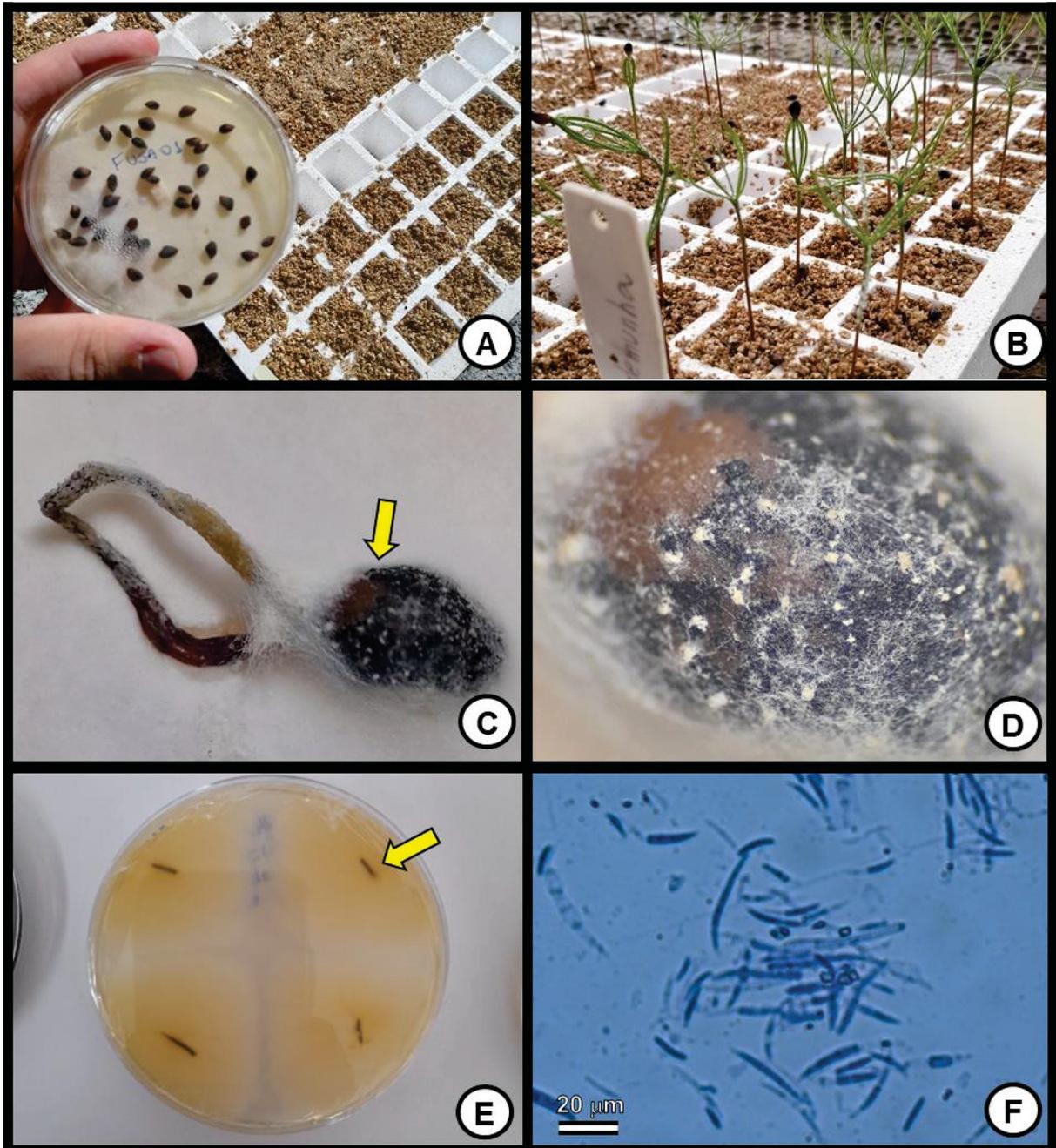
Tratamento	Emergência (%)		Semente não germinada (%)
	Sem Sintoma	Com Sintoma	
TS01	73,3 a	0,0 b	26,7 a
TS02	56,7 ab	0,0 b	43,3 a
TS03	56,7 ab	6,7 ab	36,6 a
TS04	30,0 b	23,3 a	46,6 a
TS05	80,0 a	0,0 b	20,0 a
TS06	56,7 ab	0,0 b	43,3 a
TS07	46,7 ab	6,7 ab	46,6 a
TS08	50,0 ab	3,3 ab	46,7 a

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: As variâncias foram homogêneas pelo teste de Bartlett. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Os tratamentos TS05 e TS06, utilizando o fungo *S. pallida*, não apresentaram plântulas com sintomas de tombamento, assim como a Testemunha (TS01). As plântulas com sintomas foram submetidas ao reisolamento direto e indireto. No tratamento TS03 (*S. pallida*) e TS04, foi reisolado *Fusarium* sp., e em TS07 e TS08 foi verificado que *D. pinea* causou os sintomas em todas as plântulas.

FIGURA 8 – Ensaio de patogenicidade com *Fusarium* sp. proveniente de embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliottii* var. *elliottii* em sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Colombo – PR.



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: A – Sementes tratadas pelo contato de 48 h com o micélio de *Fusarium* sp. em meio BDA e bandeja de isopor com vermiculita para a sementeira; B – Plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* germinadas; C e D – Plântula com sintomas de tombamento causados por *Fusarium* sp.; E – Reisolamento em placa de Petri com meio BDA; F – Conídios de *Fusarium* sp.

### 3.4 TESTE DE PATOGENICIDADE EM MUDAS DE *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

Os tratamentos TM01 (controle), TM02, TM03, TM04, TM05, TM06 e TM07 (controle), apresentaram descoloração das acículas e mortalidade no período de 160 dias. Pelo método de reisolamento indireto, apresentaram 16,7%; 3,3%; 13,3%; 3,3%; 10,0%; 33,3% e 3,3% de incidência de *D. pinea*, respectivamente. O tratamento TM01 (controle), apresentou 3,3% de incidência de *Fusarium* sp., enquanto os tratamentos, TM01 (controle), TM03, TM04 e TM07, apresentaram 3,3% de incidência de *Botrytis* sp.

Pelo método de reisolamento direto, os tratamentos TM01 (controle), TM02, TM03, TM04, TM05, TM06 e TM07 (controle) apresentaram 10,0%; 6,7%; 13,3%; 0,0%, 3,3%, 33,3% e 3,3% de incidência de *Fusarium* sp., respectivamente. Os tratamentos, TM01 (controle) e TM05, apresentaram 3,3% de incidência de *D. pinea*.

Os tratamentos TM08 e TM09, apresentaram 56,7% e 90% de mudas com sintomas no período de 21 dias (TABELA 12).

TABELA 12 – Percentual de mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* com sintomas, aos 21 dias após a inoculação dos 2 isolados de *Diplodia pinea* e a média do tamanho da lesão. Colombo – PR.

Tratamento	Sem sintoma	Com sintoma	Tamanho da lesão (cm)
Controle	100,0 a	0,0 a	
TM08	43,3 ± 11,5 b	56,7 ± 11,5 b	6,70 ± 2,25 a
TM09	10,0 ± 10,0 c	90,0 ± 10,0 c	6,09 ± 2,32 a

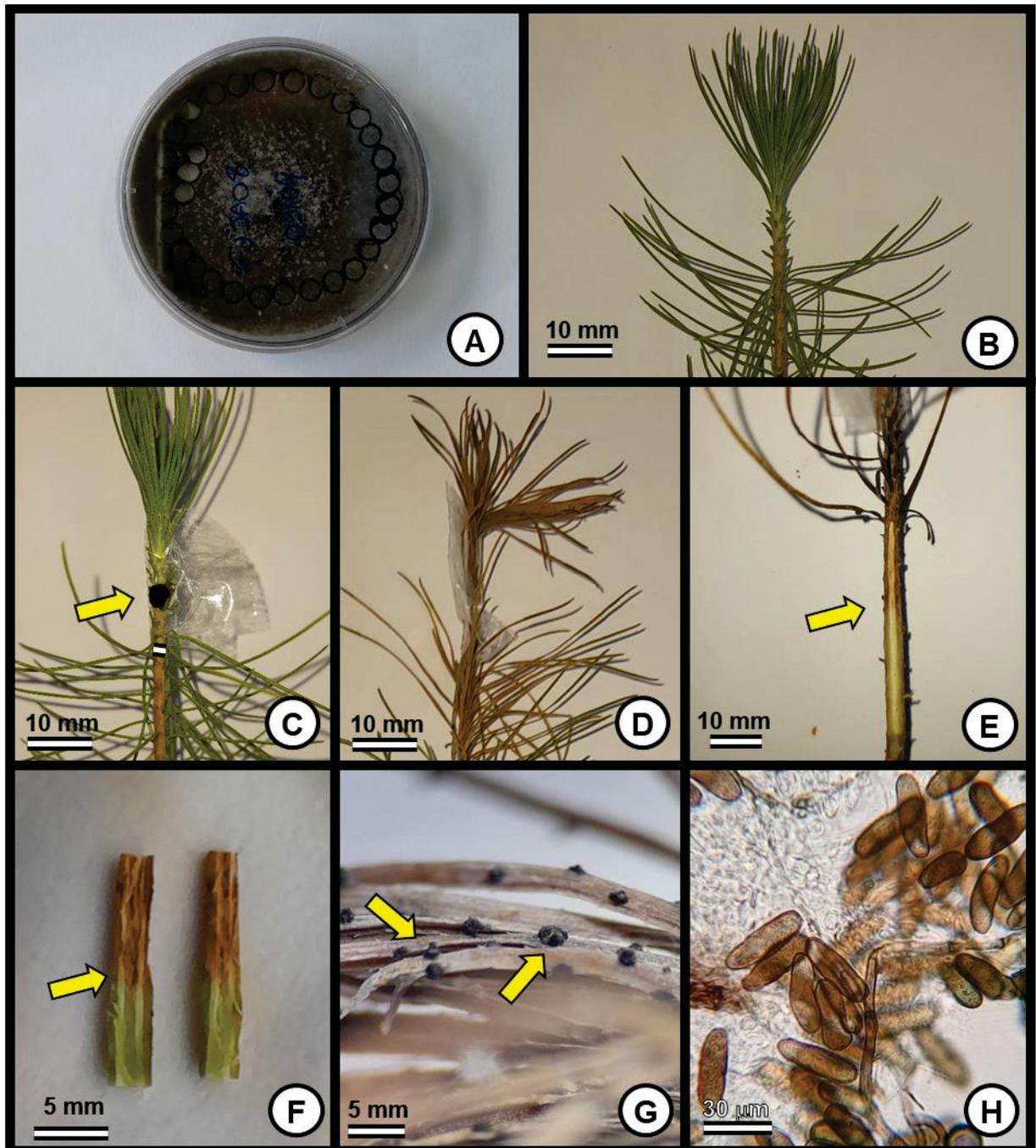
FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: As variâncias foram homogêneas pelo teste de Bartlett. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Os resultados mostraram que não houve diferença significativa no tamanho da lesão causado pelos isolados de *D. pinea* (FUJA07 e FUJA08), inoculados em mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

As mudas com sintomas foram submetidas ao reisolamento direto e indireto, nos dois tratamentos TM08 e TM09, e foram obtidos 100% de recuperação de *D. pinea* (FIGURA 9).

FIGURA 9 – Ensaio da patogenicidade de *Diplodia pinea* proveniente de embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliotii* var. *elliotii* em mudas de *Pinus elliotii* var. *elliotii*. Colombo – PR.



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: A – Cultura de *Diplodia pinea* em placa de Petri com meio BDA; B – Procedimento de retirada de acículas para inoculação; C – Inoculação do disco de meio BDA contendo micélio (seta amarela) e fixado com fita adesiva; D e E – Muda de *Pinus elliotii* var. *elliotii* com sintomas de seca de ponteiro e de necrose (seta amarela); F – Segmento do caule com necrose; G e H – Picnídios (45x) e conídios (400x) de *Diplodia pinea*.

No tratamento TM04, aos 30 dias, 3,3% apresentaram descoloração das acículas (amarelecimento), onde foi realizado o reisolamento direto, confirmando a presença de *Fusarium* sp.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Neste estudo, foram identificados os fungos: *Fusarium* sp., *S. pallida* e *D. pinea*, em associação endofítica com sementes imaturas de híbrido de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliottii* var. *elliottii*. Verificou-se, também que os isolados de *Fusarium* sp. e *D. pinea* foram patogênicos em sementes, plântulas e mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

A maioria dos patógenos transmitidos por sementes não pode ser detectada por inspeção visual, necessitando a instalação de testes para a verificar uma possível contaminação por esporos (JACCOUD FILHO; DABUL, 2011). A incidência de *Fusarium* sp. e *D. pinea* em sementes de *Pinus* spp. foi relatado para diversas espécies de *Pinus*, o que corrobora com o estudo desenvolvido (CARMO, 2017; SILVA et al., 2017; LASCA et al, 1971). O gênero *Fusarium* é responsável por danos em sementes, afetando a germinação, podendo ser transmitido para as mudas, onde pode causar podridão radicular e tombamento de plântulas (SANTOS, PARISI, 2011). *Fusarium* é considerado um dos principais gêneros de fitopatógenos associados a sementes de espécies florestais (SANTOS et al., 2011).

Assim, os fungos constatados nas sementes do híbrido *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *P. elliottii* var. *elliottii* podem surgir como contaminantes de cultivo de explantes de *Pinus*, impedindo a propagação desta conífera *in vitro*, além de poder causar doença em plântulas e mudas, como são os casos de *Fusarium* sp. e de *D. pinea* (AUER, SANTOS, 2016). Para o fungo *S. pallida*, não há registros da sua associação em sementes de *Pinus*. Este seria o seu primeiro relato em sementes e embriões imaturos de *Pinus* no Brasil.

### 4.2 TESTE DE PATOGENICIDADE EM PLÂNTULAS DE *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

Neste trabalho, verificou-se que *Fusarium* sp. causou o tombamento e a morte de plântulas *in vitro* de *P. elliottii* var. *elliottii*. Em mudas, há relatos da associação de *Fusarium* spp. com o tombamento das plântulas de *P. elliottii* (HOMECHIN et al, 1986),

e mortalidade de plântulas de *P. taeda* (SILVA et al., 2017) e redução do peso de matéria fresca e seca e a mortalidade de plântulas de *Pinus elliottii* quando associadas a *F. sambucinum* (MACIEL et al, 2013).

Neste experimento, *D. pinea* causou a seca de ponteiro e a morte de plântulas *in vitro* de *P. elliottii*. Plântulas de *Pinus pseudostrobus* Lindl. foram mais suscetíveis ao *D. pinea*, quando comparados a *P. oocarpa* (REES, WEBBER, 1988).

#### 4.3 TESTE DE PATOGENICIDADE EM SEMENTES DE *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

No experimento com sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, observou-se que *Fusarium* sp. e *D. pinea* foram transmitidos via semente para a plântula, causando sintomas de tombamento e seca de ponteiros. Este tipo de comportamento de *Fusarium* também foi constatado em estudos para verificação da transmissão e patogenicidade via sementes, em espécies de *Pinus elliottii* (MACIEL, 2012; CARMO, 2017), *P. taeda* (SILVA et al., 2017; GRIGOLETTI JUNIOR; AUER, 2006). Este fato também foi verificado em espécies florestais nativas como cedro (*Cedrela fissilis* (Vell.) Kuntze) (BENETTI et al., 2009; SANTOS, PARISI, 2011), paineira (*Ceiba speciosa* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) (LAZAROTTO et al, 2010) e de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) (SÁ et al, 2011)

Alguns estudos relataram a presença de *D. pinea* em sementes, e em cones que não se abrem como em *P. radiata* e *P. patula*, estando o fungo de forma latente, presente no interior dos mesmos (STANOSZ et al., 1997; SMITH et al., 1996). Smith et al. (2000) também relataram a presença de infecção latente em cones maduros com três anos de idade de *P. patula* e *P. radiata*. Tais condições explicariam a presença de *D. pinea* junto aos megagametófitos do híbrido estudado.

Outros estudos com *D. pinea* corroboraram os resultados do presente trabalho, assim como, quando o fungo foi inoculado em sementes de *Pinus oocarpa*, *P. caribaea* e *P. pseudostrobus* causando a podridão da semente, redução da germinação e tombamento de plântulas (REES; WEBBER, 1988; STANOSZ et al., 1997). Todavia, em *P. nigra* J.F. Arnold, foi observada uma baixa transmissão via sementes (DECOURCELLE et al, 2015) e o mesmo foi observado em *P. patula* e *P. radiata* (BIHON et al, 2011). Em sementes de *P. elliottii* deste estudo, a inoculação de *D. pinea* causou sintomas em todas as plântulas, causando a seca de gemas e ponteiros.

#### 4.4 TESTE DE PATOGENICIDADE EM MUDAS DE *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

A principal doença que ocorre em viveiros de pínus é o tombamento de muda, entretanto, as podridões-de-raízes e a seca de ponteiros podem ocorrer (AUER et al., 2001). Mudanças de *P. taeda* inoculadas com *Fusarium* spp. apresentaram sintomas na parte aérea como a redução do crescimento, descoloração das acículas, seguido de murcha e morte, 10 dias após a inoculação (SILVA et al, 2017). No sistema radicular, houve redução no desenvolvimento e necrose das raízes atacadas, quando comparadas com raízes de plantas sadias (GRIGOLETTI JUNIOR; AUER, 2006). Neste trabalho desenvolvido em mudas de *P. elliottii*, também houve a descoloração das acículas, e a morte da muda, causados por *Fusarium* sp.

Em mudas de *P. elliottii* deste trabalho, *D. pinea* causou um alto percentual de sintomas, desde a seca de ponteiros até a morte das mudas. Este tipo de resultado também foi observado por Basilio (2013) em mudas de *P. taeda* e *P. elliottii* var *elliottii* inoculadas com discos de micélio de *D. pinea*. Tais resultados foram relatados por Corrêa et al (2012) em mudas de *P. radiata* quando realizadas injúrias e a inoculação com *D. pinea*, com lesões mais severas. Em mudas de pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), inoculados com *D. pinea* também se verificou seca de ramos (CORRÊA et al., 2012).

Outro aspecto do fungo *D. pinea* é a sua associação com outros fungos, como *Fusarium circinatum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Botryosphaeria dothidea*, onde agrava ou causa maior dano à planta hospedeira (WINGFIELD; KNOX-DAVIES, 1980). Basílio (2013) relatou a presença de *Pestalotia* sp., *Alternaria* sp. e *Botryodiplodia* sp. isolados de mudas de *P. taeda* e *P. elliottii* var *elliottii* que haviam sido inoculadas com *D. pinea*. Também, neste trabalho foi relatada a presença de *Botrytis* sp. e outros gêneros de fungos, nas mudas inoculadas com *D. pinea*.

## 5 CONCLUSÕES

- Os fungos endofíticos *Fusarium* sp. e *Diplodia pinea* foram patogênicos em sementes, plântulas *in vitro* e mudas de *P. elliotii* var. *elliotii*.
- O fungo *Sporothrix pallida* teve seu primeiro relato em sementes e embriões imaturos de *Pinus* no Brasil.

## RECOMENDAÇÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Os isolados de *Sporothrix pallida* deverão ser testados como promotor de crescimento em plântulas de pínus, pois visualmente promoveram melhor desenvolvimento de plântulas de *P. elliotii* var. *elliotii in vitro* quando comparados a testemunha.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. V. de; SOUSA, V. A. de; FRITZSONS, E. PINTO JUNIOR, J. E. **Programa de melhoramento de pínus da Embrapa Florestas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. (Documentos 233 / Embrapa Florestas) Disponível em <<http://www.cnpf.embrapa.br/publica/seriedoc/edicoes/doc233.pdf>>. Acesso em: 12 de fev. 2021.
- AGUIAR, A. V. de; SOUSA, V. A. de; SHIMIZU, J. Y. **Cultivo de pínus**. Embrapa Florestas. Versão eletrônica. Sistema de Produção, 5, 2014. 2ªed. Disponível em <[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemaasdeproducaolf6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-2&p\\_p\\_col\\_pos=1&p\\_p\\_col\\_count=2&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaold=3715&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicold=3235](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemaasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=3715&p_r_p_-996514994_topicold=3235)>. Acesso em: 12 de fev. 2021.
- ALMEIDA, F. D. A. C. et al. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, p. 295-302, 2002.
- ALMEIDA, N. F.; BORTOLETTO JÚNIOR, G.; MENDES, R. F.; SURDI, P. G. Avaliação da madeira de *Pinus elliotii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* para a produção de compensados. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 40, n. 96, p. 435-443, 2012.
- ALMEIDA, N. F.; BORTOLETTO JÚNIOR, G.; MENDES, R. F.; SURDI, P. G. Produção e avaliação da qualidade de lâminas de madeira de um híbrido de *Pinus elliotii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 21, n. 2, p. 261-268, 2014.
- ALVES, D. R.; SILVA, W. M. B. da; SANTOS, D. L. dos; FREIRE, F. das C. de O.; VASCONCELOS, F. R.; MORAIS, S. M. de. Atividades antioxidante, anticolinesterásica e citotóxica de metabolitos de fungos endofíticos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 9, p. 73684-73691, sep. 2020

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products.

**Fungal Diversity**, Kunming, v. 41, n. 1, p. 1–16, 2010.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 90, n. 6, p. 1829–1845, 2011.

ANTONELLI, P. de O. Estaquia de matrizes adultas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*. **Dissertação**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2013. DOI 10.11606/D.11.2013.tde-11092013-173126

ARAÚJO, D. S.; SOARES, F. S.; SOBRINHO, S. P.; LUZ, P. B. Crioprotetores na criopreservação de sementes de *Passiflora mucronata* Lam. Iheringia, **Série Botânica**, v. 74, p. e2019008, 2019. DOI: <https://doi.org/10.21826/2446-82312019v74e2019008>

ARAÚJO, D.S.; LUZ, P.B.; NEVES, L.G.; PAIVA SOBRINHO, S. 2016. Seed cryopreservation of *Passiflora* species. **Journal of Seed Science**. 38:248–253. doi: 10.1590/2317-1545v38n3154922.

ARESB. Associação dos Resinadores do Brasil. **Produção nacional de goma resina de pinus**. Disponível em: <http://www.aresb.com.br/portal/estatisticas/>. Acesso em: 22 de abril de 2021.

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

ARRILLAGA, I.; MORCILLO, M.; ZANÓN, I.; LARIO, F.; SEGURA, J.; SALES, E. New approaches to optimize somatic embryogenesis in maritime pine. **Frontiers in Plant Science**. 10, 138, 2019.

ASHWOOD-SMITH, M. J. Genetic Damage Is Not Produced by Normal Cryopreservation Procedures Involving either Glycerol or Dimethyl Sulfoxide: A Cautionary Note, However, on Possible Effects of Dimethyl Sulfoxide. **Cryobiology**, v. 22, p. 427-433, 1985.

ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e Clonagem. In: BORÉM, A. **Biotecnologia Florestal**, Viçosa: Ed. UFV, 2007, pp. 93-121.

- ASSIS, T.F., MAFIA, R.G. (2007) Hibridação clonagem. In: Borém A (ed) **Biotecnologia Florestal**, Viçosa, pp 93-121
- AUER, C. A., SANTOS, A. F. dos. Doenças. In: AGUIAR, A. V. de; SOUSA, V. A. de; SHIMIZU, J. Y. **Cultivo de Pínus**. Embrapa Florestas. Versão eletrônica. Sistema de Produção, 5, 2014. 2ªed. Disponível em <[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistema\\_deproducao\\_lf6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistema_deproducao_lf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-)
- AUER, C. G.; SANTOS, A. F. Doenças dos pinheiros. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Org.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p. 595-602.
- AUER, C.G. Microrganismos internos em sementes de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari e *P. oocarpa* Schiede. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.19, n.1, p.45, jan./mar. 1993.
- AUER, C.G.; GRIGOLETTI, J. A.; SANTOS, A. F. **Doenças em pínus: identificação e controle**. Embrapa Florestas. Circular técnica. 48. 28p. Colombo. 2001.
- AUER, C.G.; SANTOS, A.F. dos. Detecção de *Fusarium* em sementes de pinus. In: SANTOS, A.F. dos; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M.(Eds). **Patologia de Sementes Florestais**. EMBRAPA Florestas, p.63-67, 2011.
- BÁNKI, O., ROSKOV, Y., VANDEPITTE, L., DEWALT, R. E., REMSEN, D., SCHALK, P., ORRELL, T., KEPING, M., MILLER, J., AALBU, R., ADLARD, R., ADRIAENSSENS, E., AEDO, C., AESCHT, E., AKKARI, N., ALONSO-ZARAZAGA, M. A., ALVAREZ, B., ALVAREZ, F., ANDERSON, G., et al. (2021). **Catalogue of Life Checklist** (Version 2021-10-18). *Catalogue of Life*. <https://doi.org/10.48580/d4t2>
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustred genera of imperfect fungi**. 3.ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.
- BASILIO, P. R. R. C. Caracterização morfofisiológica, patogênica e molecular de isolados de *Diplodia pinea*. 2013. 86 f. **Tese** (Doutorado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

- BECWAR MR, PULLMAN GS (1995) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). In: JAIN SM, GUPTA PK, NEWTON RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants—gymnosperm. **Springer**, Dordrecht, pp 287–301
- BENETTI, S.C. et al. Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. e *Pestalotia* sp. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.58, p. 79-83, 2009
- BENSON, J. D; WOODS, E. J.; WALTERS, E. M.; CRITSER, J. K. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682-99, 2012.
- BIERNASKI, F. A.; NOGUEIRA, A. C.; TAMBARUSSI, E. V.; WEBER, R. L. M.; STAHL, J. Influência do método de propagação e tipos de recipientes na qualidade de mudas de *Pinus maximinoi* H. E. Moore. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.14 n.26; p. 396. 2017.
- BIHON, W.; SLIPPERS, B.; BURGUES, T.; WINGFIELD, M. J., WINGFIELD, B. D. Sources of *Diplodia pinea* endophytic infections in *Pinus patula* and *P. radiata* seedlings in South Africa. **Forest Pathology**. 41(5):370-375. 2011.
- BOZHKOVA, P. e ARNOLD, S. (1998). Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. **Physiologia Plantarum** 104: 211-24.
- BUCKERIDGE, M. S. et al. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.38. p.141-156. 2000.
- BUCKERIDGE, M.D., AIDAR, M.P.M., SANTOS, H.P. TINÉ, M.A.S. Acúmulo de reservas. In: A. G. FERREIRA; F. BORGHETTI (eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed, pp. 31-50. 2004.
- BURGESS, T. I.; GORDON, T. R.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B.D. Geographic isolation of *Diplodia scrobiculata* and its association with native *Pinus radiata*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n.12, p. 1399-1406, dec, 2004.
- CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa–SPI/Embrapa–CNPH, v. 1, p. 183-260, 1998.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; VILLARINO, A.; SEIXAS, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; TRENZI, H.; GUERRA, M. P. Differential proteomic analysis of developmental

stages of *Acca sellowiana* somatic embryos. **Acta Physiologiae Plantarum**, 31: 501-514, 2009.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M.P. Morphological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, 224: 33–40, 2004.

CAPPA, E. P.; MARCÓ, M.; NIKLES, D. G.; LAST, I. S. Performance of *Pinus elliottii*, *Pinus caribaea*, their F1, F2 and backcross hybrids and *Pinus taeda* to 10 years in the Mesopotamia region, Argentina. **New Forests** (2013) 44:197–218 DOI 10.1007/s11056-012-9311-2

CARDOSO, I. M. de A. S. Embriogênese somática de gueroaba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] com ênfase em aspectos anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais .2018. 359 f. **Tese** (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade de Brasília, Brasília. 2018.

CARMO, A. L. M. do. *Fusarium* em sementes de pínus no Brasil: distribuição, patogenicidade, identificação de espécies e controle biológico. 2017. 87 f. **Tese** (Doutorado em Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

CARNEROS, E., TORIBIO, M., CELESTINO, C. (2017). Effect of ABA, the auxin antagonist PCIB and partial desiccation on stone pine somatic embryo maturation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 131(3), 445–458. doi:10.1007/s11240-017-1296-2

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. EMBRAPA. Campina Grande: EMBRAPA Algodão. Documentos. 115, 2003

CARVALHO, L.R.; SILVA, E.A.A.; DAVIDE, A.C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.

CASSELLS, A.C. Contamination and its impact in tissue culture. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 560, p. 353-359, 2001.

CHALUPA, V. (1985) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. **Commun. Inst. For. Cech**,14, 57-63

COKE, J. E. **Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of Loblolly pines**. US Patent 5534434. <http://www.freepatentsonline.com/5534434.html>, 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

CORRÊA, P; R. R.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. dos; HIGA, A. R. Seleção precoce de progênies de *Pinus radiata* a *Sphaeropsis sapinea*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p. 275-281, abr.-jun., 2012.

DE OLIVEIRA, Y. M. M.; DE OLIVEIRA, E. B. **Plantações florestais: geração de benefícios com baixo impacto ambiental**. Embrapa Florestas-Livro científico (ALICE). 1. Ed. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/florestas/publicacoes>>.

DE WET, J.; BURGESS, T.; SLIPPERS, B.; PREISIG, O. D.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 557-566, 2003

DECOURCELLE, T., PIOU, D., DESPREZ-LOUSTAU, M-L. 2015. Detection of *Diplodia sapinea* in Corsican pine seeds. **Plant Pathology**, 64:442–449

DEGENHARDT-GOLDBACH, J. Micropropagação de pinus por meio de embriogênese somática. In: AGUIAR, A. V. de; SOUSA, V. A. de; SHIMIZU, J. Y. **Cultivo de Pinus**. Embrapa Florestas. Versão eletrônica. Sistema de Produção, 5, 2014. 2ªed. Disponível em

<[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemaasdeproducaolf6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-2&p\\_p\\_col\\_pos=1&p\\_p\\_col\\_count=2&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaold=3715&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicold=3235](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemaasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=3715&p_r_p_-996514994_topicold=3235)>. Acesso em: 12 de fev. 2021.

DEMERRITT, M. E. JR.; GARRET, P. W. Adaptation of eastern white pine provenances to planting sites. Research Paper NE-703, USDA Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station, Radnor, PA. 1996. 7 p.

DENNISTON, R. S.; MICHELET, S.; GODKE, R. Principles of cryopreservation. In. TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. Cryopreservation in aquatic species. **World Aquaculture Society**, p. 59-74, 2000.

DIAS, F. P. Caracterização proteômica, fisiológica e histoquímica de cultura embriogênicas de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, Araucariaceae mantidas em suspensão celular. 2016. 109 f. **Dissertação** (Mestrado em Recursos genéticos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2016.

DIETERS, M.; BRAUNER, J. Productivity of *Pinus elliottii*, *P. caribaea* and their F1 and F2 hybrids to 15 years in Queensland, Australia. **Annals of Forest Science**, Les Ulis, n. 64, p.691-698, 2007.

DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**. 14: 243-250, 1993.

DUTTA, D; PUZARI, K. C; GOGOI, R; DUTTA, P. Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57 n.5, p 621-629, 2014.

ENGELMANN, F. In vitro conservation of tropical plant germplasm - a review. **Euphytica**, v. 57, p. 22-243, 1991.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.47, p. 5-16, 2011.

FARIA, A.D., LUZ, P.B.D., SOBRINO, S.D.P., MEDEIROS, C.M.D., TAVARES, A.R., SOARES, F.S. (2020) Efficacy of passion fruit cryopreservation using cryoprotectant agents. **International Journal of Fruit Science** Volume 20, 2020

FEHÉR, A.; PASTERNAK T.; DUDITS, D. (2003) Transition of somatic plant cells to na embryogenic state. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. **74**: 201-228.

FEHÉR, A.; PASTERNAK T.; OTVOS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. (2002). Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**. 57: 5-12.

- FELBER, A. C. et al. Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. **Annals of Microbiology**, v. 66, p.765–775, 2016.
- FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **O Biológico**, São Paulo, n. 1-2, p. 73-82, jan. 2001.
- FISCHER, D.B. 1968. Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. **Histochemie**, 16: 92-96.
- 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, É., BERNIER-CARDOU, M., ISABEL, N., KLIMASZEWSKA, K., PLOURDE, A. (2000). Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 62(1), 27–37. doi:10.1023/a:1006402215457
- GONZALEZ-ARNAO, M. T.; PANTA A.; ROCA, W.M.; ESCOBAR R. H.; ENGELMANN F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 92: 1-13, 2008.
- GRATTAPALIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa – CNPH, 1998. p. 183-260.
- GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G. **Fusariose em mudas de *Pinus taeda***. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. (Comunicado Técnico, 166).
- GUNDEL, P. E.; MARTINEZ-GUERSAL, M. A.; BATISTA, W. B.; GHERSA, C. M. Dynamics of Neotyphodium endophyte infection in ageing seed pools: incidence of differential viability loss of endophyte, infected seed and non infected seed. **Annals of Applied Biology**, v. 156, n. 2 p. 199-209, 2010.
- HERINGER, A. S. Embriogênese somática e criopreservação de embriões somáticos em pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). 2013. 128 f. **Dissertação** (Mestrado em Recursos genéticos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2013.
- HOMECHIN, M; PIZZINATTO, M. A.; MENTEN, J. O. M. Sanidade de sementes de *P. elliotii* var. *elliotii* var. *elliotii* e *Pinus taeda* e patogenicidade de *Fusarium*

*oxysporum* em plântulas de *P. elliotii* var. *elliotii* var. *elliotii*. **Summa Phytopatologica**, v.12, p.102-112. 1986.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**. v.46, p.205-229, 2003.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da extração vegetal e da Silvicultura**, 2019. Disponível em:

<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-ecuarria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-da-silvicultura.html?edicao=29153&t=resultados>.

INDUSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ - **Relatório anual 2020**. Disponível em <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf>>. Acesso em: 12 de fev. 2021.

INPE & Funcate. (2017). Anthropization data: The Cerrado between 2013 and 2015. Available at <http://combateaodesmatamento.mma.gov.br/analises-no-cerrado>.

JACCOUD FILHO, D. S.; DABUL, A. N. G. Novos métodos de detecção de fungos em sementes florestais. In: SANTOS, A. F. et al. **Patologia de sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. p. 69-86.

JARAMILLO, S.; BAENA, M. **Manual de apoio à formação e treino em conservação ex situ de recursos fitogenéticos**. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, 2002.

JAREK, T. M. Fusariose da pupunheira no Brasil: métodos de inoculação, efeito da compactação do solo, patogenicidade e identificação de espécies. 2018. 94 f. **Tese** (Doutorado em Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: WH Freeman, 1962. 408p.

JIA, M.; CHEN, L.; XIN, H. L.; ZHENG, C. J.; RAHMAN, K.; HAN, T.; QIN, L. P. A. Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants. **Journal Frontier's in Microbiology**. v.7, p 907, 2016.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growthregulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v.47, n.2-3, p. 91-110, 2005.

JONES N. B., van STADEN, J. (2001) Improved somatic embryo production from embryogenic tissue of *Pinus patula*. **Vitro Cell Dev Biol Plant** 37:543–549

JONES, N. B.; VAN STADEN, J. (1995). Plantlet production from somatic embryos of *Pinus patula*. **Journal of Plant Physiology**, 145(4), 519–525. doi:10.1016/s0176-1617(11)81781-5

KLIMASZEWSKA, K., SMITH, D. R. (1997). Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. **Physiologia Plantarum**, 100(4), 949–957. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb00

KOEHLER, A. D. Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG E STS E DE PULSOS DE 2,4-D. 2004. 73 f. **Tese** (Doutorado em Botânica) – Universidade de Viçosa, Viçosa. 2004.

KVAALEN, H.; JOHNSEN, Ø. Timing of bud set in *Picea abies* is regulated by a memory of temperature during zygotic and somatic embryogenesis. **New Phytologist**. 2008, 177, 49–59.

LARA-CHAVEZ, A., EGERTSDOTTER, U.; FLINN, B. S. (2012). Comparison of gene expression markers during zygotic and somatic embryogenesis in pine. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 48(3), 341–354. doi:10.1007/s11627-012-9440-5

LASCA, C. C.; SAMPAIO, A. S.; CINTRA, A. F. Condições fitossanitárias de sementes importadas de *Pinus* spp. **O Biológico**, São Paulo, v. 37, n. 11, p. 287-292, 1971.

LAZAROTTO, M., MUNIZ, M. F. B., SANTOS, A. F. dos. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.134-139, 2010.

LI, X.Y., HUANG, F.H., MURPHY, J.B. et al. Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 34, 22–26 (1998).

<https://doi.org/10.1007/BF02823118>

LV C, HUANG B (2012) Stem Tissue Culture of *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*. **International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology**, 1700-1703. 10.1109/iCBEB.2012.366

- MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B.; MILANESI, P. M.; LAZAROTTO, M.; BLUME, E. First report of *Fusarium sambucinum* associated on *P. elliotii* var. *elliotii* seeds in Brazil. **Plant Disease**, v.97, n.7, p.995. 2013. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1045-PDN>.
- MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F.; LAZAROTTO, M. Detecção, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes de angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*). **Summa Phytopathologica**, v.38, n.4, p.323-328. 2012.
- MALABADI, R. B.; DA SILVA, J. A. T.; MULGUND, G. S. (2011) Induction of somatic embryogenesis in *Pinus caribaea*. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**. 5 (Special Issue 1), 27-32
- MALABADI, R. B.; GANGADHAR, S. M.; NATARAJA, K. (2005). Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Pinus kesiya* (Rolye ex. Gord.) influenced by triacontanol. **Acta Physiologiae Plantarum**, 27(4), 531–537. doi:10.1007/s11738-005-0059-6
- MARTIN, A. B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGO, P.; HITA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenesis and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, 154: 143-151, 2000
- 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. DOI 10.1007/s11627-006-9003-8
- McMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, v. 23, p. 99-108, 1948.
- MENEGHETTI, E. C. Propagação clonal de *Pinus elliotii* x *Pinus caribaea*. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” **Tese Fisiologia e Bioquímica de Plantas Piracicaba 2020**
- MERKLE, S. A.; DEAN, J. FD. Forest tree biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 298-302, 2000.

- MERKLE, S.; PARROTT, W.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 155-203.
- MIGUEL, C., GONCALVES, S., TERESO, S., MARUM, L., OLIVEIRA, M. M. (2004) Somatic embryogenesis from 20 open-pollinated seed families of Portuguese plus trees of maritime pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 76:121–130
- MONCALEÁN, P.; GARCÍA-MENDIGUREN, O.; NOVÁK, O.; STRNAD, M.; GOICOA, T.; UGARTE, M.D.; MONTALBÁN, I.A. Temperature and water availability during maturation affect the cytokinins and auxins profile of radiata pine somatic embryos. **Frontiers in Plant Science**. 9, 1898, 2018.
- MONTALBÁN, I. A.; DE DIEGO, N.; MONCALEÁN, P. (2011). Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments. **Acta Physiologiae Plantarum**, 34(2), 451–460. doi:10.1007/s11738-011-0841-6
- NAGMANI R, BONGA JM (1985) Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. **Canadian Journal of Forest Research**, 15(6): 1088-1091.
- NAKKANONG, K.; NUALSRI, C. Cryopreservation of *Hevea brasiliensis* zygotic embryos by vitrification and encapsulation-dehydration. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 45, p. 333-339, 2018.
- NASCIMENTO, A. M. M. DO, BARROSO, P. A., NASCIMENTO, N. F. F. DO, GOICOA, T., UGARTE, M. D., MONTALBÁN, I. A., MONCALEÁN, P. (2020). *Pinus* spp. Somatic Embryo Conversion under High Temperature: Effect on the Morphological and Physiological Characteristics of Plantlets. **Forests**, 11(11), 1181. doi:10.3390/f11111181
- 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.
- NIKLES D. G. Experience with some *Pinus* hybrids in Queensland, Australia. In: *Proceedings of Symposium on Hybrid Breeding and Genetics*; 2000, Noosa. Noosa: Queensland **Forestry Research Institute**; 2000. p. 27-43.
- NIKLES, D.G. (2000) Experience with some *Pinus* hybrids in Queensland, Australia. In: Dungey HS, Dieters MJ, Nikles DG (Eds) *Proceedings of QFRI/CRC-SPF*

**Symposium:** Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees. Noosa, Queensland, pp 27-43

NORSTOG K, RHAMSTINE E (1967) Isolation and culture of haploid and diploid cycad tissues. **Phytomorphology** 17: 374–381

NUNES, S., MARUM, L., FARINHA, N., TOLENTINO, V., ALMEIDA, T., DIAS, M., SANTOS, C. (2017b) Plant regeneration from ploidy-stable cryopreserved embryogenic lines of the hybrid *Pinus elliottii* x *P. caribaea*. **Industrial Crops and Products** 105:215–224

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, 2017a.

OLIVEIRA, E.C.S. Efeito de diferentes diluidores sobre a congelação do sêmen canino. 2003. 61 f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2003.

PAIVA, J.R. Conservação ex situ de recursos genéticos de plantas na região tropical úmida. **Acta Amazonica**, v.24, n.1/2, p.63-80. 1994.

PANG, Z.-H.; CHEN, D.-X.; ZHAO-ZHI, M.O.; LU, S.-Z.; LIANG Y.-F. Study on the output of resin and its chemical composition from australia pine hybrid. **China Forestry Science and Technology**, Guangxi, v. 23, n. 6, p. 43-57, 2009.

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.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied: preparative and optical technology** 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingston, 1980. 439 p.

PEIXOTO NETO, P.A de S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 70-84, 2003.

- PIGATO, S. M. P. C.; LOPES, C. R. Avaliação da variabilidade genética em quatro gerações de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake por meio de marcador molecular RAPD. **Scientia Florestalis**, n. 60, p. 119-133, 2001.
- PIRES, E. I.; RESENDE, M. D. V.; SILVA, R. L.; RESENDE JUNIOR, M. F. R. **Genética florestal**. Viçosa, MG: Arka, 2011. 318 p.
- PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annual Review of Phytopathology**, n. 49, p. 291-315, 2011.
- 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.
- 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.
- QUISEN, R. C.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J. **Metodologia de descontaminação e germinação de sementes de *Pinus taeda* L.** Colombo: Embrapa Florestas, 2020. 6p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico nº 449).
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, v.78, p.437-442, 1977.
- QUOIRIN, M.; VIEIRA, R. C. Rhizogenesis and nodule formation from callus of *Eucalyptus grandis*, and *E. grandis* x *urophylla*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 38, n. 3, p. 793-798, 1995
- RAMAROSANDRATANA A, HARVENGT L, BOUVET A, CALVAYRAC R, PAQUES M (2001) Influence of the embryonal-suspensor mass (ESM) sampling on development and proliferation of maritime pine somatic embryos. **Plant Science** 160(3):473–479
- 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.
- REED, B. M., NORMAH, M. N., KUSHNARENKO, S. V. Cryopreservation of Plant Cells, Tissues, and Organs. In: TRIGIANO, R. N., GRAY, D. J. **Plant Tissue**

**Culture, Development, and Biotechnology.** 2010. 608 p. DOI:

<https://doi.org/10.1201/9781439896143>

REES, A. A.; WEBBER, J. F. Pathogenicity of *Sphaeropsis sapinea* to seed, seedlings and saplings of some Central American pines. Transactions of the British. **Mycological Society**, London, v. 91, n. 2, p. 273-277, 1988

REGO, S. S. Germinação, morfologia e sanidade de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg e *Myrceugenia gertii* Landrum - Myrtaceae. 2008. 114 f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RESENDE, M. D. V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes.** Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2002. 975p.

ROCHA, P.; NIELLA, F. Efecto de tratamientos inductivos en el enraizamiento de estacas de *Pinus elliottii x caribaea* y *P. taeda*. In: JORNADAS TÉCNICAS FORESTALES, 9., 2002, Eldorado. **Anais...** Eldorado: INTA, Facultad de Ciencias Forestales, 2002. p. 50-54.

SÁ, D. A. C.; SANTOS, G. R. dos; FURTADO, G. Q.; ERASMO, E. A. L.; NASCIMENTO, I. R. do. Transporte, patogenicidade e transmissibilidade de fungos associados as sementes de pinhão manso. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4, p.663-669, 2011.

SANTA-CATARINA, C., SILVEIRA, V., GUERRA, M. P., STEINER, N., MACEDO, A. F., FLOH, E. I. S., dos SANTOS, A. L. W. 2013. The use of somatic embryogenesis for mass clonal propagation and biochemical and physiological studies in woody plants. **Current Opinion in Plant Biology.** 13:103-119.

SANTOS, A. F. dos; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. **Patologia de Sementes Florestais.** Colombo: Embrapa Florestas. 2011. 236 p.

SANTOS, A.F. dos; REGO, S.S. Hospedeiros, métodos de detecção e fungos encontrados em sementes florestais. In: SANTOS, A.F. dos; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M. **Patologia de Sementes Florestais.** EMBRAPA Florestas, p.115-188, cap.9, 2011.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. **Manual de curadores de germoplasma – vegetal: criopreservação**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 16p.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.20, p.60-65. 2001.

SESTREM, M. S. C. da S. Estudo das etapas iniciais da embriogênese somática em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. 2018. 56 f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

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

SHIMIZU, J. Y. **Pínus na silvicultura brasileira**. Embrapa Florestas, Colombo. 2008. 223p.

SHIMIZU, J. Y.; SEBBENN, A. M.; AGUIAR, A. V. Produção de resina de pínus e melhoramento genético. In: SHIMIZU, J. Y. (Ed.). **Pinus na silvicultura brasileira**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. p. 193-206.

SHOJI M., SATO H., NAKAGAWA R., FUNADA R., KUBO T., OGITA S. (2006). Influence of osmotic pressure on somatic embryo maturation in *Pinus densiflora*. **Journal of Forestry Research**. 11 449–453. 10.1007/s10310-006-0227-6

SILVA, F. A. S. **ASSISTAT: Versão 7.7 beta**. DEAG - CTRN - UFCG – Atualizado em 01 de abril de 2014. Disponível em <<http://www.assistat.com/>>. Acessado em: 12 de junho de 2016

SILVA, T. W. R. da; SANTOS, A. F. dos; AUER, C. G.; TESSMANN, D. J. Métodos de detecção, transmissão e patogenicidade de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda*. **Ciência Florestal**. v. 27 n.1. p. 73-84. Mar 2017.

<https://doi.org/10.5902/1980509826448>

- 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
- SMITH, H., WINGFIELD, M. J., CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 62, n. 2, p. 86-88, 1996.
- SMITH, H.; WINGFIELD, M.J.; de WET, J.; COUTINHO, T. A. Genetic diversity of *Sphaeropsis sapinea* from South Africa and Northern Sumatra. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 2, p.139-142, 2000.
- SOUSA, G. C.; CLEMENTE, P. L.; ISAAC, V. L. R.; FARIA, S. P.; CAMPOS, M. R. C. Contaminação microbiana na propagação in vitro de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 405-407, 2007.
- SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; PAZ, O. P. da; MONTARROYOS, A. V. V.; SANTOS, V. da S.; MORAIS, L. S. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação in vitro de variedades de mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular técnica, 90).
- STAMP, J. A. Somatic embryogenesis in cassava: The anatomy and morphology of the regeneration process. **Annals of Botany**, 57: 451-459, 1987.
- STANOSZ, G. R.; SMITH, D. R.; GUTHMILLER, M. A.; STANOSZ, J. C. Persistence of *Sphaeropsis sapinea* in or on asymptomatic shoots of red and jack pines. **Mycologia**, New York, v. 89, n. 4, p. 525-530, 1997.
- 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.
- STEWART, F., MAPES, M.O., MEARS, K. (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**:705-708.
- SUN, T.; WANG, Y.; ZHU, L.; LIU, X.; WANG, Q.; YE, J. (2021). Evaluation of somatic embryo production during embryogenic tissue proliferation stage using

- morphology, maternal genotype, proliferation rate and tissue age of *Pinus thunbergii* Parl. **Journal of Forestry Research**. doi:10.1007/s11676-021-01311-1
- SURDI, P. G.; BORTOLETTO JÚNIOR, G.; MENDES, R. F.; ALMEIDA, N. F. Use of hybrid *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* and *Pinus taeda* L. in the production of OSB panels. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 43, n. 108, p. 763-772, 2015.
- SUZUKI, A. B. P.; BERTONCELLI, D. J.; ALVES, G. A. C.; de FARIA, R. T. (2018). Criopreservação de sementes da orquídea brasileira em extinção *Cattleya granulosa* Lindl. **Iheringia, Série Botânica.**, 73(2), 146–150. <https://doi.org/10.21826/2446-8231201873206>
- TAIZ, L et al. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Artmed: Porto Alegre, 2017
- TANG, W.; NEWTON, R. J. Loblolly pine (*Pinus taeda*). Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. **Forestry Sciences**, v. 77, p. 95-106, 2005.
- TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L.C.; DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1873 – 1899, 1991.
- TEIXEIRA, A. S.; FALTUS, M.; ZAMECNIK, J.; BENITO, G. M. E.; GARCIA, M. A. D. Glass transition and heat capacity behaviors of plant vitrification solutions. **Thermochimica Acta**, v. 593, p. 43-49, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/j100677a022>
- 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.
- TOZZI, H. H.; TAKAKI, M. Histochemical analysis of seed reserve mobilization in *Passiflora edulis* Sims fo. *flavicarpa* O. Deg. (yellow passion fruit) during germination. **Brazilian Journal of Biology**, 71: 701-708, 2011.
- URAGAMI, A.; SAKAI, A.; NAGAI, M.; TAKAHASHI, T. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.8, n.7, p.418-421, 1989.
- VALENTE, C. Caracterização de funções mitocôndrias em *Araucaria angustifolia*. 2007. 97 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Bioquímicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

- WINGFIELD, M.J.; KNOX-DAVIES, P. S. Association of *Diplodia pinea* with a root disease of pines in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul. v. 64, p. 221-223, 1980
- YANG, X.; ZHANG, X. (2010). Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants, **Critical Reviews in Plant Sciences**. 29: 36-57.
- YEUNG, E.C. (1995) Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis In vitro embryogenesis in plants. **Springer**, p. 205-247.
- YILDIRIM T, KAYA Z, IŞIK K (2006) Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* TEN. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 87(1):67–7
- ZANELLA, L. B. Embriogênese somática em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. 2016. 54 f. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.
- ZANELLA, L., FRANCISCON, L., GRUNENVALDT, R., TOMASI, J., & DEGENHARDT-GOLDBACH, J. (2018). Micropropagação de *Pinus tecunumanii*. **Ciência Florestal**, 28(2), 651-660. doi:<https://doi.org/10.5902/1980509832058>
- ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants, **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411 – 1423, 1993.