

Claudete Santa Catarina

**Crescimento *in vitro* e caracterização bioquímica,
morfológica e histoquímica de culturas embriogênicas de
Ocotea catharinensis Mez. (Lauraceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Vegetal da
Universidade Federal de Santa Catarina,
para a obtenção do grau de MESTRE EM
BIOLOGIA VEGETAL.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Maria Viana

**Florianópolis
2001**

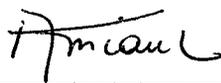
**"CRESCIMENTO *IN VITRO* E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA,
MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS
DE *Ocotea catharinensis* MEZ. (LAURACEAE)"**

POR

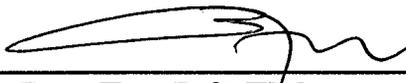
CLAUDETE SANTA CATARINA

**Dissertação julgada e aprovada, em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora.**

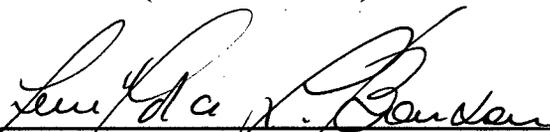
Comissão Examinadora:



**Profa. Dra. Ana Maria Viana
(BOT/CCB/UFSC)**



**Profa. Dra. Eny I. S. Floh
(BOT/IB/USP)**



**Profa. Dra. Zenilda Bouzon
(BEG/CCB/UFSC)**

Dedico este trabalho

**aos meus pais, Carmen Maria e Henrique
e ao meu noivo Vanildo**

Claudete Santa Catarina

**Crescimento *in vitro* e caracterização bioquímica,
morfológica e histoquímica de culturas embriogênicas de
Ocotea catharinensis Mez. (Lauraceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Vegetal da
Universidade Federal de Santa Catarina,
para a obtenção do grau de MESTRE EM
BIOLOGIA VEGETAL.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Maria Viana

**Florianópolis
2001**

Dedico este trabalho

**aos meus pais, Carmen Maria e Henrique
e ao meu noivo Vanildo**

AGRADECIMENTOS

Quero registrar aqui, minha gratidão ...

À professora Dra. Ana Maria Viana, pela orientação, paciência e ensinamentos, os quais foram fundamentais para a concepção e realização deste trabalho.

Às professoras, Dra. Áurea Maria Randi, pela co-orientação nos experimentos relacionados com a determinação dos níveis de açúcares solúveis totais, proteínas totais e amido, e Dra. Zenilda Laurita Bouzon, pela co-orientação nos experimentos relacionados com as análises morfológicas e histoquímicas.

Ao meu noivo, Vanildo Silveira, pelo amor e compreensão em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Danilo Wilhelm Filho, Dra. Nocy Moraes, Dra. Marisa Santos, Dra. Vetúria Lopes, Dr. João de Deus Medeiros e Dra. Margherita Barracco, por disponibilizarem parte da infra-estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Aos colegas da primeira turma: Sônia, Annete, Roseli, Oscar e Francis pela amizade construída, pelas sugestões e alegrias partilhadas durante este período.

Aos amigos Eduardo Nunes, Juliana Moser e Alexandre Siminski, do Laboratório de Fisiologia Vegetal, e Luciane Ouriques, do Laboratório de Algas Marinhas, pelas sugestões e pelos momentos de descontração durante a realização do trabalho.

À Raquel Regina Bonelli, pela revisão final deste trabalho e pelas sugestões valiosas e, à Maristela Petri, pelo auxílio na correção do mesmo.

Às professoras Dra. Maria Terezinha Paulilo e Dra. Clarice Loguercio-Leite pelas sugestões.

Aos funcionários Silvana, Nauro, Xisto e Anselmo pelo auxílio prestado.

Ao professor Dr. Enio Luiz Pedrotti, pela oportunidade de iniciação na carreira científica, pela minha orientação durante a graduação, pela compreensão e amizade.

À professora Dra. Eny I. S. Floh pela oportunidade de continuidade desse trabalho ao nível de Doutorado e por ter aceitado participar da banca examinadora.

A todos os professores que me transmitiram da melhor forma os ensinamentos.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de realização deste trabalho e a CAPES pelo auxílio financeiro.

À minha família, especialmente à minha mãe Carmen, meu pai Henrique e meus irmãos Cláudio, Eliane e Renato, pelo incentivo, pelas alegrias, e que mesmo distante sempre estiveram presentes.

A todos que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

A Deus, por tudo...

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMO	ii
SUMMARY	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO	4
2.1. <i>Biologia, importância econômica e medicinal de Ocotea catharinensis</i>	4
2.2. <i>Biotecnologia de Ocotea catharinensis e outras espécies de Lauraceas</i>	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. <i>Material</i>	9
3.2. <i>Métodos</i>	11
3.2.1. Preparo do meio de cultura	11
3.2.2. Condições de crescimento das culturas	11
3.2.3. Estabelecimento da curva de crescimento das culturas embriogênicas	11
3.2.4. Determinação do teor de água de culturas embriogênicas	11
3.2.5. Determinação do teor de água em embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento	12
3.2.6. Determinação das frequências de embriões somáticos nos diferentes estágios de desenvolvimento em culturas embriogênicas com diferentes idades	12
3.2.7. Avaliação do potencial de embriogênese secundária de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento durante a subcultura de culturas embriogênicas	12
3.2.8. Avaliação dos efeitos do sorbitol e do carvão ativado no crescimento e no teor de água de culturas embriogênicas	13
3.2.9. Avaliação do efeito da desidratação lenta na redução da matéria fresca de embriões somáticos maduros	13
3.2.10. Determinação dos níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido	13
3.2.11. Análises morfológicas e histoquímicas	16
3.2.12. Análise estatística	18
4. RESULTADOS	20
4.1. <i>Avaliação do crescimento das culturas embriogênicas em meio de cultura padrão</i>	20
4.1.1. Padrão de crescimento	20
4.1.2. Determinação do teor de água e da razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca	24
4.1.3. Frequência de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento	26
4.1.4. Determinação do teor de água e da razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento	28
4.2. <i>Avaliação do potencial de embriogênese secundária de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento durante a subcultura de culturas embriogênicas</i>	31
4.2.1. Oxidação das culturas embriogênicas	31
4.2.2. Crescimento de culturas embriogênicas	32
4.2.3. Frequência de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento	34
4.2.4. Crescimento dos embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento	36
4.3. <i>Avaliação do efeito do sorbitol e do carvão ativado na oxidação, crescimento, teor de água e razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca de culturas embriogênicas</i>	39
4.3.1. Oxidação das culturas embriogênicas	39

4.3.2. Crescimento das culturas embriogênicas	40
4.3.3. Determinação do teor de água em culturas embriogênicas	43
4.3.4. Frequência de embriões somáticos	44
4.4. <i>Efeito da desidratação lenta de embriões somáticos na redução da matéria fresca</i>	46
4.4.1. Curva de redução da matéria fresca	46
4.4.2. Determinação dos pesos de matéria seca	48
4.5. <i>Determinação dos níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido</i>	49
4.5.1. Níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em culturas embriogênicas	49
4.5.2. Níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento	51
4.5.3. Efeito do sorbitol e do carvão ativado nos níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em culturas embriogênicas	55
4.5.4. Níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em embriões somáticos desidratados	59
4.6. <i>Caracterização morfológica e histoquímica</i>	61
4.6.1. Caracterização morfológica de embriões somáticos nos estágios de desenvolvimento	61
4.6.2. Caracterização histoquímica de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento	68
4.6.3. Caracterização histoquímica de embriões somáticos crescidos em diferentes concentrações de sorbitol e de carvão ativado	69
4.6.4. Caracterização histoquímica de embriões somáticos desidratados	70
5. DISCUSSÃO	79
5.1. <i>Crescimento e determinação dos níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido</i>	79
5.2. <i>Caracterização morfológica e histoquímica</i>	92
6. CONCLUSÕES	100
7. BIBLIOGRAFIA CITADA	103

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	- Azul de Anilina
AB	- Azul de Alcian
AT-O	- Azul de Toluidina
CBB	- Azul brilhante de Coomassie
DAP	- Diâmetro a altura do peito
HCl	- Ácido clorídrico
nm	- Namômetro
N	- Normal
NaOH	- Hidróxido de sódio
µg	- micrograma
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
M	- Molar
MCW	- Metanol:Clorofórmio:Água
SB-B	- Sudan negro
PAS	- Ácido Periódico de Schiff
WPM	- Meio de cultura de Lloyd & McCown (1981), Wood Plant Medium.

RESUMO

Ocotea catharinensis Mez. (Lauraceae) é uma importante espécie florestal para a produção de madeira, em risco de extinção, nativa da Mata Atlântica localizada no Sul do Brasil. Esta espécie produz sementes esporadicamente, cuja viabilidade é reduzida drasticamente após poucos meses de armazenamento. Um sistema de embriogênese somática de alta frequência foi desenvolvido para esta espécie. Entretanto, a taxa de conversão de embriões somáticos em plantas é baixa. O enfoque deste estudo foi a avaliação do crescimento *in vitro* das culturas embriogênicas, em diferentes condições de cultura, e realizar análises bioquímicas e histoquímicas de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento (globular, cotiledonar inicial, cotiledonar intermediário e maduro). O aumento em matéria fresca e seca foi lento nas duas primeiras semanas de cultura. Durante o período de cultura houve uma redução na frequência de embriões somáticos no estágio globular e um aumento na frequência de embriões somáticos nos estágios cotiledonar inicial, cotiledonar intermediário e maduro. Embriões somáticos nos estágios iniciais de desenvolvimento apresentaram maiores valores de razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca do que os embriões nos estágios cotiledonar intermediário e maduro. Portanto, a expansão dos embriões somáticos nos estágios finais de desenvolvimento foi devida, principalmente, à absorção de água. Culturas embriogênicas nas duas primeiras semanas, apresentaram níveis significativamente maiores de proteínas totais e açúcares solúveis totais. Entretanto, maiores níveis de amido foram observados em culturas embriogênicas após três, quatro e cinco semanas de cultura. Embriões somáticos no estágio globular acumularam maiores níveis de proteínas totais e menores níveis de açúcares solúveis totais e amido, enquanto que os embriões nos estágios cotiledonar intermediário e maduro apresentaram maiores níveis de açúcares solúveis totais e amido. Não foram observadas mudanças nos níveis de amido durante os tratamentos de desidratação de embriões somáticos maduros, mas os níveis de açúcares solúveis totais diminuíram significativamente e os níveis de proteínas totais aumentaram após dois a três dias. Embriões somáticos nos estágios iniciais de desenvolvimento apresentaram menor taxa de oxidação e maior potencial de embriogênese secundária, sendo o melhor explante para a subcultura. O maior crescimento em matéria seca das culturas foi promovido com 11 g.L⁻¹ de sorbitol. Altas concentrações de sorbitol, ou a adição de carvão ativado combinado com sorbitol, reduziram significativamente as taxas de crescimento das culturas. As frequências de embriões somáticos nos estágios cotiledonar inicial, cotiledonar intermediário e maduro foram significativamente menores na presença de carvão ativado combinado com sorbitol. Os maiores níveis de proteínas totais foram observados com 2,75 g.L⁻¹ de sorbitol, na ausência de carvão ativado, enquanto que maiores níveis de açúcares solúveis totais e menores níveis de amido foram observados quando concentrações de sorbitol foram combinadas com carvão ativado. Embriões somáticos maduros apresentaram cotilédones grandes, com a protoderme bem formada e feixes vasculares. O parênquima de armazenamento apresentou-se bem desenvolvido, contendo células secretoras. O eixo embrionário não apresentou organização completa, mas foi observado um meristema apical da raiz bem formado. Também foram observadas células meristemáticas na região do meristema apical do ramo. O polo radicular é o local de embriogênese secundária e as células desta região produzem diretamente, agregados celulares embriogênicos e embriões

secundários. Os estudos histoquímicos sobre polissacarídeos e lipídios, realizados com o reagente ácido periódico de Schiff e Sudan negro, mostraram que amido e lipídios são os principais compostos de reserva acumulados no parênquima cotiledonar dos embriões somáticos nos estágios iniciais e maduros de desenvolvimento. Eles estão localizados nas células do parênquima do cotilédone, especialmente nas camadas periféricas do cotilédone. As proteínas foram abundantes em embriões somáticos nos estágios iniciais de desenvolvimento, entretanto, pequena quantidade de proteína foi detectada nas células do parênquima cotiledonar de embriões somáticos maduros.

SUMMARY

Ocotea catharinensis Mez. (Lauraceae) is a valuable hardwood forest tree species on the verge of extinction from the Atlantic rainforest located in southern Brazil. It produces seeds erratically, whose viability is drastically reduced over a few months of storage. A high-frequency somatic embryogenesis system has been developed for this species. However, the rate of plant conversion from somatic embryos is still low. This study is focussed on the assessment of in vitro growth of embryogenic cultures under different culture conditions and on biochemical and histochemical analysis of somatic embryos at different developmental stages (globular, pre-cotyledonary, cotyledonary and mature). The increase in fresh and dry weight was slow in the first two weeks of culture. During the culturing period there was a reduction in the frequency of somatic embryos at globular stage and increasing rates of somatic embryos at pre-cotyledonary, cotyledonary and mature stages were observed. Somatic embryos at early stages of development showed higher dry weight/fresh weight rates than those at cotyledonary and mature stages. Therefore, somatic embryo expansion at the latter stages of development was mainly due to water uptake. Embryogenic cultures in the first two weeks showed significantly higher levels of total proteins and total soluble sugars. However, higher levels of starch were observed in the cultures after three, four and five weeks. Somatic embryos at globular stages accumulated higher levels of total proteins and lower levels of total sugars and starch, while those at cotyledonary and mature stage showed higher levels of soluble sugars and starch. No changes were observed in the levels of starch during the desiccation treatments of mature somatic embryos, but total soluble sugars decreased significantly and total proteins increased after two-three days. Somatic embryos at early stages of development showed the lowest oxidation rates and the higher potential for secondary embryogenesis, being the best explants for subculturing. Sorbitol at 11 g.L^{-1} supported the highest increase in dry weight of the cultures. Higher sorbitol concentrations or the addition of activated charcoal combined with sorbitol to the culture medium reduced significantly the culture growth rates. The frequencies of somatic embryos at pre-cotyledonary, cotyledonary and mature stages were significantly lower in the presence of activated charcoal combined with sorbitol. The highest levels of total proteins were observed at 2.75 g.L^{-1} sorbitol in the absence of activated charcoal, while the highest levels of soluble sugars and the lowest levels of starch, occurred when concentrations of sorbitol were combined with activated charcoal. Mature somatic embryos showed large cotyledons with well-formed epidermis and vascular bundles. The storage parenchyma was well developed and contained secretory cells. The embryo axis was poorly developed but a well-formed root meristem was observed. Meristematic cells were also observed in the apical meristem region. The root pole is a site of secondary embryogenesis and the cells within this part of the embryo produces directly embryogenic cell aggregates and secondary embryos. The histochemical studies on carbohydrates and lipids carried out using Periodic Acid Schiff reagent and Sudan Black B, showed that starch and lipids were the main storage compounds accumulating in the parenchyma of somatic embryo cotyledons at early and mature stages of development. They were located throughout the cotyledon parenchyma and specially in the outer layers of cotyledons. Proteins were abundant in somatic embryos at early stages of development but very little protein was detected in the parenchyma cells of mature somatic embryos.

1. INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica está localizada na Encosta Atlântica entre as latitudes 6°S e 30°S e longitudes 30°W para 50°W, com altitudes variando do nível do mar até 2700 metros. O território original da Floresta Atlântica ocupava toda a zona costeira brasileira, do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul e se estendia por centenas de quilômetros, continente adentro, nas regiões sul e sudeste, chegando a Argentina e Paraguai. Inicialmente, a Floresta Atlântica recobria cerca de 12% do território brasileiro (Lima & Capobianco, 1997). Nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná, atualmente restam apenas 10-19% da floresta original e Santa Catarina é o Estado com a maior área de floresta remanescente, com 31% (CIMA, 1991). Apesar da devastação acentuada, esta floresta ainda apresenta o mais alto nível de diversidade de plantas, aproximadamente 10 mil espécies, sendo que 50% são endêmicas, ou seja, não podem ser encontradas em nenhum outro local (Fundação SOS Mata Atlântica, 1992; Lima & Capobianco, 1997; Viana *et al.*, 1999).

Fatores como a contínua, intensiva e seletiva extração de madeira, a expansão da agricultura nas últimas décadas e o crescimento populacional na costa Atlântica do Brasil, contribuíram para que a Floresta Atlântica se tornasse um dos ecossistemas com maiores riscos de extinção do mundo (Fundação SOS Mata Atlântica, 1992). Além disso, alguns fatores como a floração esporádica e a baixa viabilidade das sementes, podem interferir na regeneração natural e disponibilidade de plântulas para programas de reflorestamento. O crescimento lento de várias espécies nativas brasileiras e o pouco conhecimento disponível sobre a ecologia e reprodução vegetativa, são outros fatores limitantes à produção comercial e regeneração artificial (Carvalho, 1994; Viana *et al.*, 1999). Assim, programas de conservação têm sido estabelecidos para um número reduzido de espécies nativas brasileiras.

Segundo Viana *et al.* (1999), o estabelecimento de estratégias de conservação das espécies florestais nativas exige informações sobre a biologia reprodutiva e a ecologia, bem como a interação das mesmas com informações oriundas de estudos básicos sobre a variabilidade genética e marcadores moleculares. Além disso, estes autores ressaltam a necessidade de informações provenientes de estudos básicos sobre sistemas de cultura de embriões zigóticos,

embriogênese somática e micropropagação, complementadas com a caracterização molecular. Tais estudos fornecerão as bases para a integração com as abordagens convencionais, possibilitando a conservação de germoplasma de espécies nativas brasileiras, a curto, médio e longo prazo.

Técnicas biotecnológicas podem ser aplicadas para espécies lenhosas, que são caracterizadas por um longo período de maturação e baixa viabilidade de sementes, bem como para espécies de difícil propagação através de métodos convencionais (Jain & Ishii, 1998). Segundo Litz *et al.* (1998), estas técnicas apresentam potencial para prover métodos eficientes de micropropagação e melhoramento genético a partir de células somáticas e transformação genética, e para a conservação de germoplasma de espécies tropicais e subtropicais. Além disso, a cultura de tecidos vegetais é de grande importância na propagação, em larga escala, de espécies florestais de interesse para futuros programas de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas (Viana *et al.*, 1999). Sistemas de embriogênese somática e de micropropagação a partir de segmentos nodais, gemas apicais ou meristemas têm sido utilizados com sucesso na multiplicação e conservação de várias espécies lenhosas (Attree & Fowke, 1993; Park *et al.*, 1998; Jain & Ishii, 1998). Segundo Ammirato (1983), a embriogênese somática é um processo análogo à embriogênese zigótica em que, uma única célula ou um grupo de células vegetativas são precursoras de embriões somáticos. Este processo envolve uma série de estágios de desenvolvimento, que se aproxima da seqüência de eventos representativos da embriogênese zigótica (Jain & Ishii, 1998). Segundo Merkle & Dean (2000), a embriogênese somática apresenta muitas vantagens sobre outros sistemas de propagação *in vitro*, pois propicia altas taxas de multiplicação e potencial de produção em larga escala, através das tecnologias de bioreatores e de sementes sintéticas, além do fato que culturas embriogênicas são apropriadas para a transferência de genes. Segundo Vicient & Martinez (1998), além da aplicação dos embriões somáticos como sementes sintéticas e no melhoramento das culturas, os mesmos são de interesse especial na preservação de germoplasma e produção de metabólitos secundários *in vitro*.

Sistemas de embriogênese somáticas têm sido desenvolvidos para várias espécies lenhosas. Entretanto, uma limitação destes sistemas é a pequena taxa de conversão de embriões somáticos em plantas completas (Viana & Mantell, 1999). Esta limitação tem sido observada para algumas espécies, como por exemplo

Ocotea catharinensis (Viana, 1998), *Swietenia macrophylla* (Maruyama & Ishii, 1999), *Eucalyptus grandis* e *E. dunni* (Watt et al., 1999) e *Persea americana* Mill. (Witjaksono et al., 1999). O bloqueio no desenvolvimento ou o desenvolvimento anormal dos embriões somáticos são as causas das restrições observadas no processo de conversão destes embriões em plantas. Neste sentido, é necessário desenvolver pesquisas visando elucidar e superar os possíveis bloqueios impostos ao desenvolvimento normal destes embriões, o que levará à otimização dos sistemas de embriogênese somática. Portanto, são necessários estudos sobre a influência das condições de cultura *in vitro* na morfologia de embriões somáticos, assim como estudos bioquímicos, morfológicos e histoquímicos, que forneçam informações sobre as modificações fisiológicas e estruturais que ocorrem durante o processo de embriogênese somática.

O objetivo geral deste estudo, portanto, foi avaliar o crescimento *in vitro* das culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* Mez. (canela preta), espécie nativa da Floresta Atlântica, em diferentes condições de cultura e realizar a caracterização bioquímica, histoquímica e morfológica de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. avaliar o crescimento *in vitro* das culturas embriogênicas em meio de cultura padrão;
2. avaliar o potencial de embriogênese secundária de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento;
3. avaliar o efeito do sorbitol e carvão ativado no crescimento das culturas embriogênicas;
4. avaliar o efeito da desidratação lenta na redução da matéria fresca de embriões somáticos maduros;
5. quantificar os níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em culturas embriogênicas e em embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento;
6. realizar a caracterização histoquímica e morfológica de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento.

2. REVISÃO

2.1. Biologia, importância econômica e medicinal de *Ocotea catharinensis*

A espécie *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae), conhecida popularmente com o nome de 'canela-preta', é originária da Floresta Atlântica do Brasil (Floresta Ombrófila Densa), de ocorrência natural nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo. É uma espécie perenifólia, de climax, podendo atingir, excepcionalmente, 45 m de altura e 150 cm ou mais de diâmetro a altura do peito (DAP). No Estado de Santa Catarina, floresce de julho a março, a frutificação ocorre de novembro a dezembro, e a dispersão das sementes ocorre de forma zoocórica (Carvalho, 1994). Produz sementes esporadicamente e a viabilidade das mesmas é reduzida após poucos meses de armazenamento. Não existem informações publicadas sobre a disponibilidade de propagação vegetativa por estacas (Moura-Costa *et al.*, 1993; Carvalho, 1994). Esta espécie possui importância econômica pela produção de madeira, sendo o principal produto a madeira serrada e roliça, muito utilizada em marcenaria para uso interior e exterior, construção civil e naval, tacos, móveis, assoalhos, laminação, compensados e moirões. Também é importante, como outras espécies da família Lauraceae, pela produção de óleos essenciais. Foram identificados 10 componentes do óleo essencial da casca de *O. catharinensis*, sendo o linalol (95,7%) o principal componente. Este óleo é um produto de grande importância econômica, apreciado pelo seu aroma de rosa e utilizado em perfumaria na fabricação de cosméticos (Carvalho, 1994). Além disso, produz lignanas e neolignanas, que são compostos biologicamente ativos, com efeito citotóxico em células tumorais (Lordello, 1996). Estes compostos também foram isolados de outras espécies da família Lauraceae, como a *Endlicheria dysodantha* Mez. e a *Aniba megaphylla* Mez. (Ma *et al.*, 1991).

Devido à importância econômica, esta espécie foi intensamente explorada nas décadas de 40 a 70, e o intenso extrativismo ocasionou a redução do número de indivíduos. Atualmente, esta espécie encontra-se ameaçada de extinção no seu local de ocorrência (Viana, 1998; Viana *et al.*, 1999). Carvalho (1994) indica a necessidade urgente de estabelecimento de programas de conservação para

espécies da Floresta Atlântica, como a *O. catharinensis*. Com base nestas informações, há a necessidade do desenvolvimento de métodos não convencionais para a propagação e conservação desta espécie.

2.2. Biotecnologia de *Ocotea catharinensis* e outras espécies de Lauraceas

Um sistema de embriogênese somática de alta frequência foi desenvolvido para a *O. catharinensis* a partir cultura de embriões zigóticos (Moura-Costa *et al.*, 1993). A embriogênese somática para esta espécie inclui as fases de indução de agregados celulares utilizando embriões zigóticos maduros excisados, diferenciação dos agregados celulares para os estágios globular e cotiledonar, maturação, desidratação e germinação (Figura 1 e Figura 2 A-F).

As culturas embriogênicas de *O. catharinensis* podem ser mantidas *in vitro*, no estágio de agregados celulares indiferenciados, na presença de 2,4-D; ou em meio desprovido de reguladores de crescimento, em estágio cotiledonar inicial, a partir da embriogênese secundária repetitiva. A embriogênese secundária direta e indireta é uma característica deste sistema, desta forma, estes embriões secundários podem ser produzidos a partir de embriões em estágio cotiledonar inicial e/ou a partir de agregados celulares embriogênicos (Viana & Mantell, 1999). As limitações do sistema são as baixas taxas de conversão dos embriões somáticos em plantas. Maiores taxas de germinação foram obtidas quando embriões somáticos maduros foram desidratados por um período de quatro dias em placas de Petri, mas estes embriões não desenvolveram a plúmula (Viana, 1998). Estas limitações têm sido observadas para *Persea americana* Mill. (Witjaksono *et al.*, 1999), outra espécie da família Lauraceae.

Estudos fitoquímicos conduzidos com embriões somáticos de *O. catharinensis*, produzidos pelo sistema de embriogênese somática descrito acima, permitiram o isolamento de 15 neolignananas, sendo algumas delas detectadas pela primeira vez nesta espécie. As análises fitoquímicas dos embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento mostraram que a biossíntese das neolignananas está associada com a diferenciação celular (Lordello, 1996). Isto indica o potencial da utilização do sistema de embriogênese somática de *O. catharinensis* para futuros estudos sobre a biossíntese e produção de metabólitos secundários.

Poucos são os artigos científicos publicados em periódicos sobre abordagens biotecnológicas referentes a Lauraceas. Para *Kalmia latifolia* são descritos processos da micropropagação por cultura de ramos apicais (Lloyd & McCown, 1981) e para *Persea americana* Mill. são descritos sistemas de embriogênese somática (Pliego-Alfaro & Murashigue, 1987; Witjaksono *et al.*, 1999).

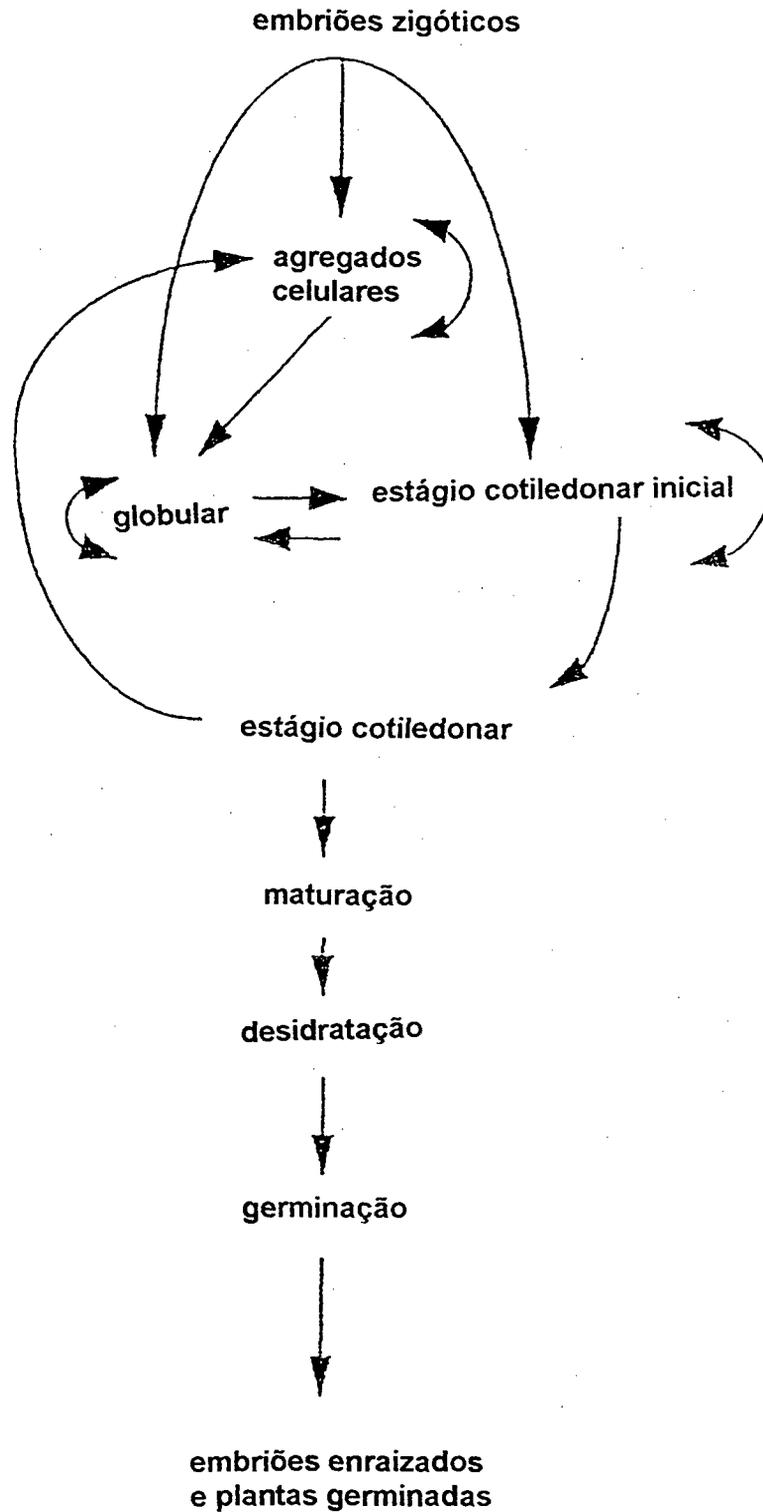


Figura 1. Fluxograma da embriogênese somática em *Ocotea catharinensis*. (Viana & Mantell, 1999).

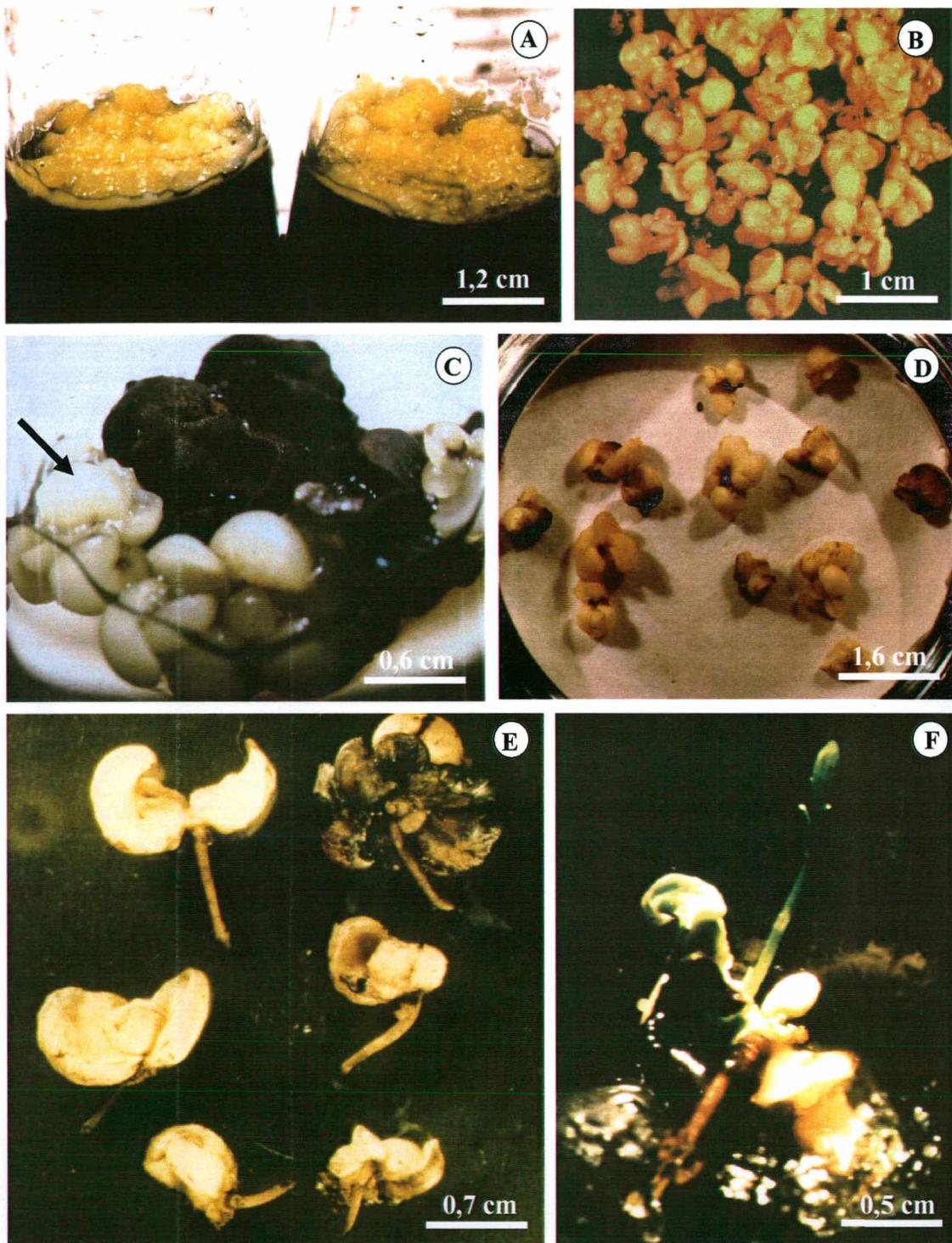


Figura 2. Embriogênese somática em *O. catharinensis*. **A.** Culturas embriogênicas na fase de agregados celulares. **B.** Embriões somáticos no estágio maduro. **C.** Embriogênese secundária a partir de embriões somáticos oxidados (seta). **D.** Embriões somáticos maduros desidratados em placas de Petri. **E.** Embriões somáticos germinados. **F.** Germinação de embriões somáticos em planta completa (Viana & Mantell, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram utilizadas culturas embriogênicas de *O. catharinensis* mantidas em meio de cultura WPM (Woody Plant Medium, Sigma Co., USA) (Lloyd & McCown, 1981) suplementado com sacarose (20 g.L⁻¹), sorbitol (22 g.L⁻¹), glutamina (0,4 g.L⁻¹) e fitagel (Phytigel, Sigma Co., USA) (2 g.L⁻¹), meio padrão estabelecido para a manutenção das mesmas (Viana, 1998).

Nos experimentos delineados para verificar o efeito dos estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos no crescimento das culturas embriogênicas, bem como para a caracterização bioquímica, histoquímica e morfológica, os mesmos foram separados por classes de tamanho (Figura 3 A-D) e morfologia, sendo classificados nos seguintes estágios:

Estágio 1 - Globular (≤ 2 mm)

Estágio 2 - Cotiledonar inicial (2 - 3,5 mm)

Estágio 3 - Cotiledonar intermediário (3,5 - 4,9 mm)

Estágio 4 - Maduro (≥ 5 mm)

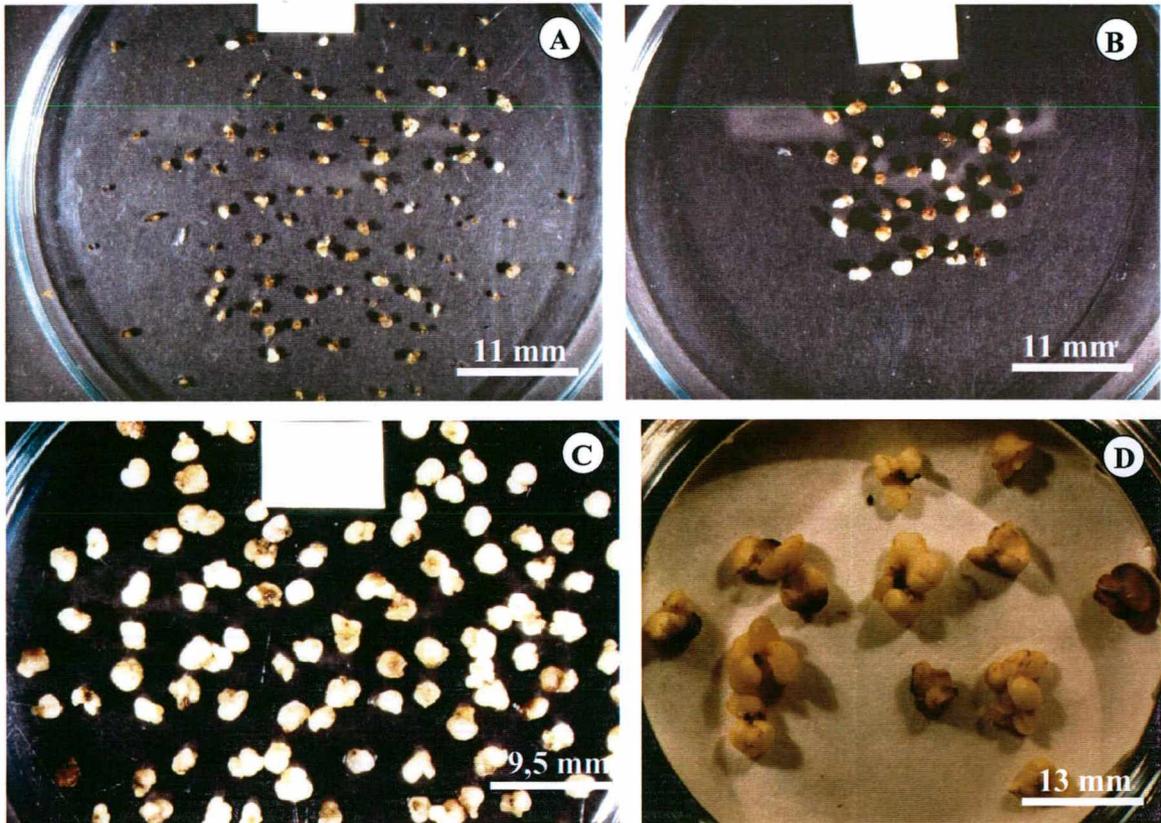


Figura 3. Embriões somáticos de *O. catharinensis* nos estágios globular (A), cotiledonar inicial (B), cotiledonar intermediário (C) e maduro (D).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo do meio de cultura

O meio de cultura WPM utilizado nos experimentos foi preparação comercial em pó. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M) antes da adição de fitagel. Em seguida, os meios foram distribuídos em tubos de ensaio (8 mL por tubo), fechados com tampa de prolipropileno e autoclavados a 121°C por 18 minutos, a 1.1 Kgf/cm².

3.2.2. Condições de crescimento das culturas

Todos os experimentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C, com fluxo de fótons de 22 μmol.m².s⁻¹, produzidos por lâmpadas fluorescentes Phillips TDL, Umidade Relativa de 70% e fotoperíodo de 16 horas.

3.2.3. Estabelecimento da curva de crescimento das culturas embriogênicas

Amostras de 12 embriões somáticos no estágio globular foram inoculadas em meio de cultura padrão (item 3.1.1). O inóculo inicial apresentou média 29,2 mg de matéria fresca. No momento da inoculação e após 1, 2, 3, 4 e 5 semanas de cultura, foram realizadas avaliações do peso de matéria fresca e de matéria seca. O peso de matéria seca foi obtido pela desidratação das culturas em estufa a 85°C, por 24 horas. Foram utilizadas 6 repetições por tratamento.

3.2.4. Determinação do teor de água de culturas embriogênicas

Amostras de 200 mg foram removidas das culturas embriogênicas em meio de cultura padrão no momento da inoculação e após 1, 2, 3, 4, e 5 semanas de cultura e foram mantidas em estufa a 85°C, por 24 horas, para a determinação dos respectivos pesos de matéria seca. O conteúdo de água foi expresso como a porcentagem de matéria seca. Foram utilizadas 4 repetições por tratamento.

3.2.5. Determinação do teor de água em embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento

Amostras de 200 mg de embriões somáticos, nos diferentes estágios de desenvolvimento especificados no item 3.1.1, foram removidas das culturas embriogênicas em meio de cultura padrão, após diferentes períodos de cultura. A seguir foram avaliadas quanto ao peso da matéria seca, conforme mencionado no item 3.2.3. Foram utilizadas 4 repetições por tratamento.

3.2.6. Determinação das freqüências de embriões somáticos nos diferentes estágios de desenvolvimento em culturas embriogênicas com diferentes idades

Amostras de 12 embriões somáticos no estágio globular foram inoculadas em meio de cultura padrão (item 3.1.1). Após períodos de 1, 2, 3, 4 e 5 semanas, as culturas foram removidas e foram determinadas as freqüências (%) de embriões somáticos nos estágios de desenvolvimento especificados no item 3.1.1. Foram analisadas 4 repetições por tratamento.

3.2.7. Avaliação do potencial de embriogênese secundária de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento durante a subcultura de culturas embriogênicas

Embriões somáticos, obtidos de culturas embriogênicas com 4 semanas de idade, foram separados em estágios de desenvolvimento conforme o item 3.1.1 e amostras de oito embriões foram inoculadas em meio de cultura padrão, para a iniciação de novas culturas. A avaliação da porcentagem de oxidação foi realizada diariamente. Após 4 semanas, as culturas foram avaliadas quanto à freqüência de embriões somáticos oxidados, quanto aos pesos de matéria fresca e de matéria seca e quanto à freqüência (%) de embriões somáticos nos diferentes estágios de desenvolvimento especificados no item 3.1.1. Foram utilizadas 5 repetições por tratamento.

3.2.8. Avaliação dos efeitos do sorbitol e do carvão ativado no crescimento e no teor de água de culturas embriogênicas

Amostras de 12 embriões somáticos no estágio globular foram inoculadas no meio de cultura padrão suplementado com diferentes concentrações de sorbitol (0; 2,75; 5,5; 11 e 22 g.L⁻¹) e de carvão ativado (0 e 3 g.L⁻¹). Após 4 semanas, as culturas foram avaliadas quanto aos pesos de matéria fresca e de matéria seca e quanto à frequência (%) de embriões somáticos nos diferentes estágios de desenvolvimento especificados no item 3.1.1. Foram utilizadas 5 repetições por tratamento. Para a determinação do teor de água das culturas crescidas nas diferentes condições acima, procedeu-se como mencionado no item 3.2.3.

3.2.9. Avaliação do efeito da desidratação lenta na redução da matéria fresca de embriões somáticos maduros

Embriões somáticos no estágio de desenvolvimento maduro, obtidos a partir de culturas com 4 - 5 semanas de idade, foram desidratados em placas de Petri contendo papel filtro por períodos de 0 a 4 dias, à 25±2°C e em ambiente com 70% de U.R. Após os diferentes períodos, as 3 amostras de 12 embriões somáticos cada, foram removidas e avaliadas quanto ao peso de matéria fresca. Para a determinação do peso da matéria seca, foram removidas 4 amostras de 200 mg de matéria fresca para cada dia de desidratação.

3.2.10. Determinação dos níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido

As extrações e dosagens de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido foram realizadas em:

- 1) culturas embriogênicas, no momento da inoculação e com 1 a 5 semanas de idade, produzidas no meio de cultura padrão (item 3.1);
- 2) embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento, no momento da inoculação e durante as semanas 1 a 5 de cultura, produzidos no meio de cultura padrão;

- 3) culturas embriogênicas com 4 semanas de idade, produzidas no meio de cultura WPM, suplementado com diferentes concentrações de sorbitol e carvão ativado;
- 4) embriões somáticos maduros (estágio 4), desidratados por um período de 0 a 4 dias.

Foram utilizadas 3 amostras de 200 mg de matéria fresca para a dosagem de cada constituinte bioquímico.

3.2.10.1. Extração e dosagem de proteínas totais

A extração das proteínas totais foi realizada segundo a metodologia de Randi & Felipe (1988). As amostras foram maceradas em graal com 4 mL de solução hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M e centrifugadas durante 10 minutos a 2000 rpm, para a obtenção do sobrenadante. Foi realizada uma segunda extração com 4 mL de NaOH 0,1M e, após a centrifugação, os dois sobrenadantes foram unidos. As proteínas foram precipitadas com 7 mL de ácido tricloroacético 10%, a 4°C, por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, foi realizada a centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As proteínas precipitadas foram ressuspensas em 2 mL de NaOH 0,1M.

A dosagem foi realizada pela metodologia de Bradford (1976), utilizando-se o reagente azul brilhante de Coomassie G-250 (Nacional). Para o preparo do reagente, foram dissolvidos 100 mg de azul brilhante de Coomassie em 50 mL de etanol 95%. Após dissolvido, foram acrescentados 100 mL de ácido ortofosfórico 85%. O volume final foi completado para 1 litro, com água destilada.

Dos extratos obtidos foram removidas alíquotas de 0,1 mL, as quais foram adicionadas a 5 mL do reagente. A absorbância foi obtida em espectrofotômetro a 595 nm. Os cálculos de proteínas totais foram realizados a partir de valores de absorbância obtidos para a curva padrão, preparada com concentrações de 0 a 1000 µg/mL de soro albumina bovina. Foram realizadas 3 repetições por amostra.

3.2.10.2. Extração e dosagem de açúcares solúveis totais

A extração dos açúcares solúveis totais foi realizada segundo a metodologia de Shannon (1968). As amostras foram maceradas em graal com 4 mL de solução MCW (metanol:clorofórmio:água) na proporção de 12:5:3, e centrifugadas durante

10 minutos a 2000 rpm para a obtenção do sobrenadante. Foi realizada uma segunda extração com 4 mL de MCW e, após a centrifugação, os dois sobrenadantes foram unidos. Para cada 4 partes de sobrenadante, foram adicionadas 1 parte de clorofórmio e 1,5 partes de água. A centrifugação foi realizada por 10 minutos a 2000 rpm e obteve-se a fase aquosa superior. Quando o extrato era muito concentrado, procedeu-se diluição em água destilada, para posterior dosagem.

A dosagem foi realizada pelo método de Umbreit & Burris (1964), utilizando-se o reagente antrona 0,2%. Para o preparo do reagente, foram dissolvidas 200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 95%. A solução foi preparada uma hora antes do uso. Alíquotas de 1 mL foram obtidas dos extratos e foram adicionadas a 2 mL de antrona 0,2%. Em seguida, as amostras foram agitadas e aquecidas em água fervente por 3 minutos. Após esfriar, em temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 620 nm. Os cálculos dos níveis de açúcares solúveis totais foram obtidos a partir da curva padrão, preparada com concentrações de 0 a 100 µg/mL de glicose.

3.2.10.3. Extração e dosagem de amido

A extração de amido foi realizada segundo a metodologia de McCready *et al.* (1950). Os resíduos das amostras utilizadas para a extração dos açúcares solúveis totais foram macerados em graal com 2 mL de ácido perclórico 30 % e centrifugados a 2000 rpm, por 10 minutos. Foi realizada uma segunda extração com 2 mL de ácido perclórico 30% e, após a centrifugação, os dois sobrenadantes foram unidos.

A dosagem foi realizada pelo método de Umbreit & Burris (1964), utilizando-se a antrona (0,2%) como reagente. Alíquotas de 1 mL dos extratos foram adicionadas a 2 mL de antrona 0,2%. Em seguida, as soluções foram agitadas e aquecidas em água fervente por 3 minutos. Após esfriar, em temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 620 nm. Os cálculos dos níveis de amido foram obtidos a partir da curva padrão, preparada com concentrações de 0 a 100 µg/mL de glicose, diluídas em ácido perclórico 30%. Os valores encontrados nas amostras foram multiplicados pelo fator 0,9 para a conversão em amido, segundo McCready *et al.* (1950).

3.2.11. Análises morfológicas e histoquímicas

As análises morfológicas e histoquímicas foram realizadas em embriões somáticos nas seguintes condições:

- 1) com 1 a 5 semanas de idade;
- 2) em diferentes estágios de desenvolvimento nas semanas 1 a 5 de cultura;
- 3) cultivados em diferentes concentrações de sorbitol e carvão ativado;
- 4) embriões maduros desidratados por 0 a 4 dias.

3.2.11.1. Processamento para a microscopia de luz de rotina e histoquímica

As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído (2,5%) em tampão fosfato (0,2 M) pH 7,3, na proporção de 1:1, durante 24 horas, à temperatura de 4°C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato, duas vezes, por 15 minutos (Bouzon, 1993), e desidratado em uma série de soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes (30, 50, 70, 90 e 100%), com 2 trocas de 15 minutos em cada concentração, à temperatura ambiente. A pré-infiltração das amostras foi realizada, inicialmente, com uma mistura 1:1 de etanol 100% e historesina Leica®, durante 12 horas; posteriormente o material foi infiltrado em historesina pura por 24 horas. A inclusão foi realizada com historesina, em cápsulas de gelatina, com a adição de polimerizador, à temperatura ambiente, por 2-3 horas (Arnold *et al.* 1975, modificado).

Para a observação de lipídios, as amostras foram fixadas em paraformaldeído (2,5%) e tampão fosfato (0,2 M) pH 7,3, na proporção de 1:1, por 24 horas, à temperatura de 4°C. Após a fixação, o material foi lavado com água destilada e tampão fosfato (1:1), duas vezes por 15 minutos em cada troca, seguido da pré-infiltração das amostras com mistura de historesina Leica® e água destilada (1:1) por 12 horas e historesina pura por 24 horas, à temperatura de 4°C (Soares, 2000). A inclusão foi realizada com historesina em cápsulas de gelatina com a adição de polimerizador, à temperatura ambiente, por 2-3 horas.

As amostras foram cortadas em micrótomo manual de parafina modelo Reichert, com navalhas de aço. Os cortes com espessuras de 4 µm foram

distendidos à temperatura ambiente, colocados diretamente nas lâminas sobre gotas de água destilada e secos em placa aquecedora a 37°C, por 30 minutos.

3.2.11.2. Observações morfológicas

Para a observação da morfologia celular e estrutural dos embriões somáticos, foi utilizado o corante azul de anilina (AA). As lâminas semipermanentes foram coradas com solução aquosa a 0,1% de AA, acidificada com HCl 1N (Bouzon, 1993).

3.2.11.3. Observação de proteínas totais

As proteínas totais foram identificadas com o corante azul brilhante de Coomassie R250, segundo a metodologia de Gahan (1984). As lâminas contendo os cortes foram tratadas com solução azul brilhante de Coomassie (CBB) 0,02% em solução etanólica acidificada de Clarke, por 24 horas. Posteriormente, foram lavadas em solução de Clarke recém preparada, por 20 minutos, seguido de água destilada. As lâminas foram secas ao ar e montadas com bálsamo do Canadá. O controle foi realizado com digestão enzimática antes dos procedimentos de coloração.

3.2.11.4. Observação de polissacarídeos

Foram observados polissacarídeos neutros, amido e celulose, e polissacarídeos ácidos. Para observar polissacarídeos neutros, foi utilizada a reação de ácido periódico de Schiff (PAS) (Bouzon, 1993) e para polissacarídeos ácidos foi utilizado o azul de toluidina (AT-O) (O'Brien *et al.*, 1965). Para observar polissacarídeos ácidos sulfatados foi utilizado o azul de alcian (AB) (La Claire & Dawes, 1976; Ravetto, 1964).

3.2.11.4.1. Polissacarídeos neutros

Para a observação de polissacarídeos neutros pelo método de PAS, os cortes foram oxidados com solução aquosa de ácido periódico a 1%, durante 20 minutos, lavados em água corrente por 10 minutos e, em seguida, corados com reativo de Schiff por 30 minutos. As lâminas contendo os cortes foram então lavadas em água

corrente por 20 minutos, até a retirada do excesso de corante, secas ao ar e montadas com bálsamo do Canadá. Como controle negativo da reação de PAS, foi omitida a oxidação dos cortes pelo ácido periódico e, em seguida, os cortes foram submetidos à coloração descrita acima (Gahan, 1984).

3.2.11.4.2. Polissacarídeos ácidos

Para a observação de polissacarídeos ácidos pela reação de metacromasia com AT-O, as lâminas contendo os cortes foram coradas por 30-60 segundos em solução azul de toluidina 0,5% pH 1,0. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada, 2 vezes de 1 minuto cada. Estas foram secas ao ar e montadas com bálsamo do Canadá. Para o controle foram utilizadas variações de pH (Gordon-Mills & McCandless, 1973; McCully, 1970).

3.2.11.4.3. Polissacarídeos ácidos sulfatados

Para observar polissacarídeos ácidos, pelo método do corante azul de alcian, as lâminas contendo os cortes foram coradas por 24 horas com solução aquosa de AB 8 GX a 1% ajustada com HCl para pH 0,5. Em seguida, foram lavadas em água corrente, secas ao ar e montadas com bálsamo do Canadá. Para o controle positivo, foi utilizada lâmina contendo material rico em polissacarídeos ácidos sulfatados (Bouzon, 1993).

3.2.11. 5. Observação de lipídios

Para a observação de lipídios, foi utilizado o corante sudan negro B (SB-B). Lâminas contendo os cortes foram lavadas em álcool 70% e coradas com SB-B por 15-30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em álcool 70% e em água destilada. Foram secas ao ar e montadas com solução aquosa de glicerina (50%) (Soares, 2000).

3.2.12. *Análise estatística*

Foi utilizado o delineamento completamente casualizado e os dados obtidos foram submetidos à Análise da Variância (ANOVA) e ao Teste de Separação de Médias de Tukey, ao nível de 5% ($P < 0,05$) (Gomez & Gomez, 1984). Os cálculos foram realizados com auxílio do software estatístico Statgraphics versão 7.0.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do crescimento das culturas embriogênicas em meio de cultura padrão

4.1.1. Padrão de crescimento

As Figuras 4A e B mostram que as culturas embriogênicas de *O. catharinensis* apresentaram aumentos significativos em matérias fresca e seca, durante as semanas de cultura *in vitro*. Verifica-se que o aumento em matérias fresca e seca foi lento nas duas primeiras semanas, alcançando os valores máximos na quinta semana. Os dados indicam que, em cinco semanas, as culturas aumentaram 33,5 vezes em relação ao inóculo inicial, em termos de matéria fresca, e 26,6 vezes, em termos de matéria seca.

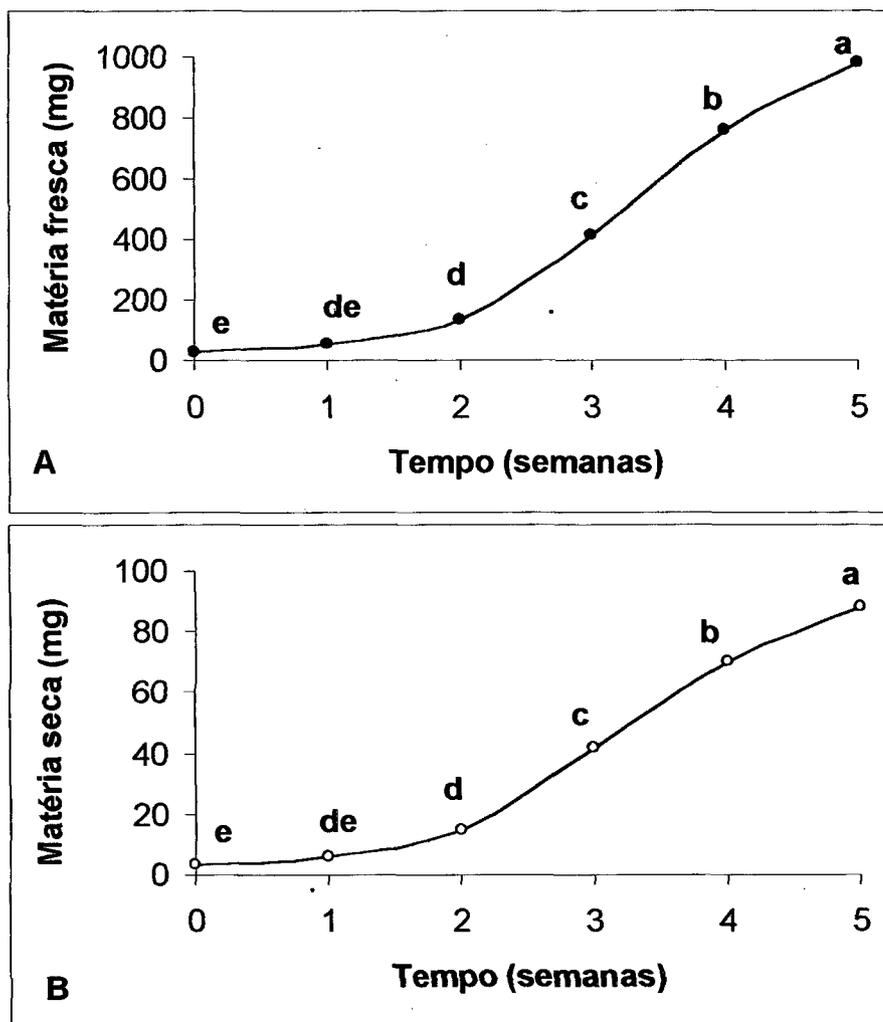


Figura 4. Curvas de crescimento de matérias fresca (A) e seca (B) de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* durante o período de cultura *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os períodos de cultura pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Quando se analisa o crescimento, em termos das taxas semanais de incremento em matérias fresca e seca (Figura 5), verifica-se que, nas primeiras semanas, as culturas embriogênicas apresentaram um incremento lento no crescimento em matéria fresca, apresentando taxas de $21,5 \text{ mg.semana}^{-1}$ na primeira semana e de $86 \text{ mg.semana}^{-1}$ na segunda semana, não diferindo estatisticamente entre si. As maiores taxas de incremento semanal em matéria fresca foram observadas na terceira e quarta semana, sendo respectivamente de $275,3 \text{ mg.semana}^{-1}$ e $350,8 \text{ mg.semana}^{-1}$, não diferindo estatisticamente entre si. No período entre a quarta e quinta semana, foram observados decréscimos nas taxas de crescimento em matéria fresca, respectivamente de $350 \text{ mg.semana}^{-1}$ na quarta semana para $215,5 \text{ mg.semana}^{-1}$ na quinta semana. Assim, a análise das taxas semanais de incremento em matéria seca mostra que as culturas embriogênicas nas duas primeiras semanas apresentaram baixas taxas de crescimento em matéria seca ($2,5$ e $9,0 \text{ mg.semana}^{-1}$, respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si. Os aumentos significativos nas taxas de crescimento em matéria seca também foram observados na terceira e quarta semana, sendo que as culturas embriogênicas da quarta semana apresentaram a taxa máxima de crescimento em matéria seca ($28,5 \text{ mg.semana}^{-1}$), não diferindo estatisticamente da terceira semana ($26,7 \text{ mg.semana}^{-1}$). Houve decréscimo na taxa de crescimento em matéria seca nas culturas embriogênicas na quinta semana ($18,3 \text{ mg.semana}^{-1}$).

A Tabela 1 indica que os valores absolutos do teor de água, em mg, nas culturas embriogênicas aumentaram significativamente durante o decorrer do período de cultura, variando de $25,8 \text{ mg}$, no início da cultura, a 890 mg na quinta semana. Isto equivale a dizer que, no início da cultura, $88,5\%$ da matéria fresca das culturas embriogênicas correspondeu à água e que este valor passou a $90,9\%$ por ocasião da quinta semana, apesar de não terem sido detectadas diferenças estatísticas significativas entre os valores. Da mesma forma observa-se, pela Figura 6, que houve um decréscimo nos valores da razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca, de $0,113$ no início da cultura, para $0,090$ na quinta semana, apesar da análise de variância não ter indicado diferenças estatísticas significativas durante o período de cultura. Assim, é possível observar que o peso da matéria seca em cada semana correspondeu a aproximadamente 10% do respectivo peso da matéria fresca, exceto para a quarta e quinta semanas.

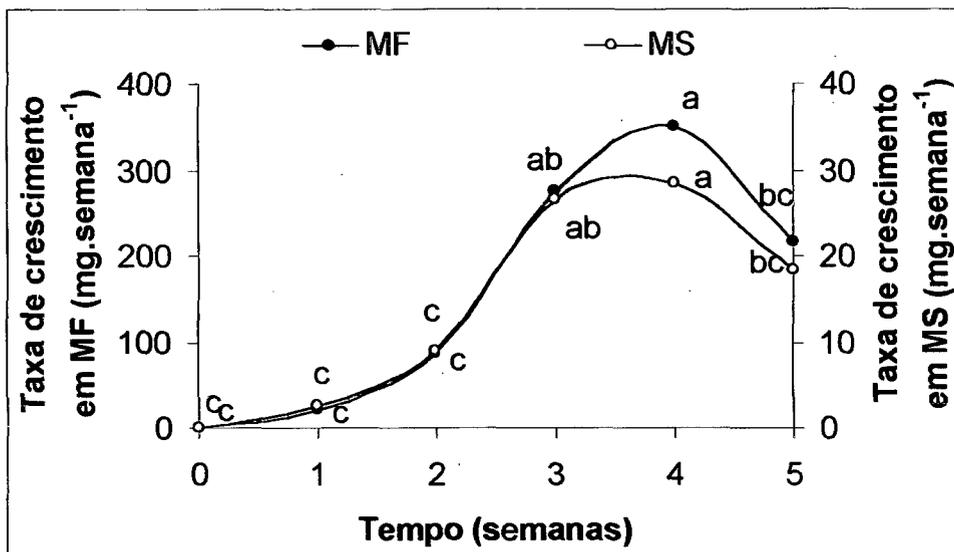


Figura 5. Taxas de crescimento (mg.semana^{-1}) em matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* em função do período de cultura *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os períodos de cultura pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 1. Teores de água (Média \pm Desvio Padrão) em culturas embriogênicas de *O. catharinensis* em diferentes períodos de cultura *in vitro*. MI = momento da inoculação.

Tempo de cultura (semanas)	Teor de água (mg)	Teor de água (%)
MI	^y 25,8 \pm 0,8 e	^y 88,5 \pm 2,4 a
1	44,8 \pm 6,1 de	88,4 \pm 2,4 a
2	121,8 \pm 12,1 d	89,1 \pm 1,9 a
3	370,5 \pm 33,5 c	89,9 \pm 0,6 a
4	692,8 \pm 56,0 b	90,8 \pm 0,8 a
5	890,0 \pm 98,6 a	90,9 \pm 0,4 a

^y Valores (N=6) da mesma coluna seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

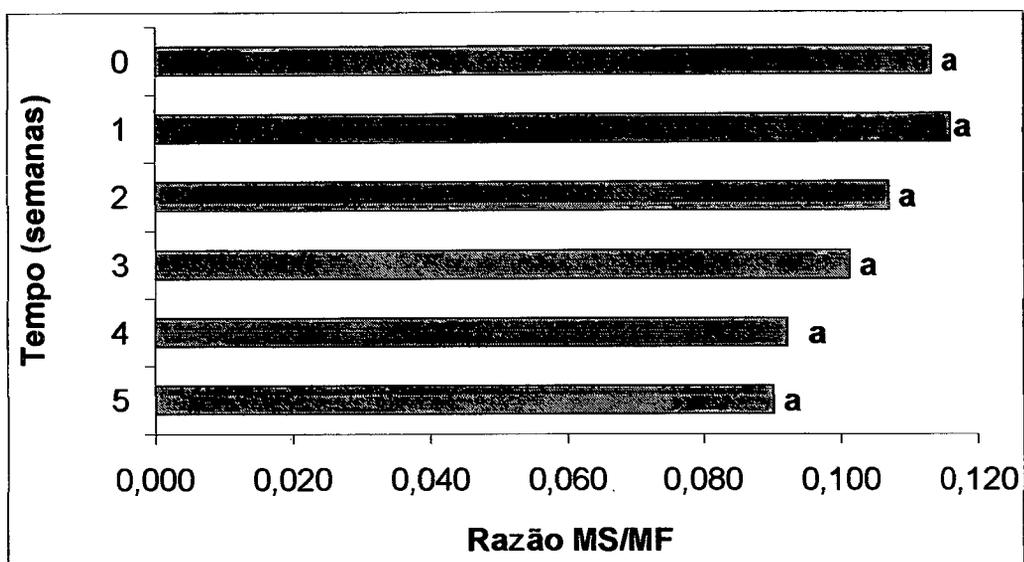


Figura 6. Razão peso de matéria seca (MS)/peso de matéria fresca (MF) de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* durante o período de cultura *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os períodos de cultura, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.1.2. Determinação do teor de água e da razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca

Este experimento foi conduzido com o objetivo de elucidar os resultados preliminares obtidos com relação à variação do teor de água das culturas, relatados no item 4.1.1.

Os resultados apresentados na Tabela 2 indicam que as amostras de 200 mg de matéria fresca, obtidas de culturas embriogênicas em diferentes períodos de cultura, apresentaram diferenças estatísticas significativas para os pesos de matéria seca e teores de água, em mg e em porcentagem. Culturas embriogênicas no momento da inoculação apresentaram valores superiores de matéria seca (27,8 mg) diferindo significativamente de culturas embriogênicas com uma (24,8 mg), quatro (24,8 mg) e cinco (21,3 mg) semanas de idade. Com relação aos valores de teor de

água, em mg, verifica-se que as culturas embriogênicas com cinco semanas de idade apresentaram o valor máximo de 178 mg de água, o que correspondeu a 89,4% da matéria fresca, diferindo estatisticamente das demais semanas. Culturas embriogênicas no momento da inoculação apresentaram resultados inferiores para teor de água, apenas 86,5% da matéria fresca, não diferindo estatisticamente dos teores de água de culturas embriogênicas com duas (86,9%) e três (86,8%) semanas. Observa-se também pela Figura 7, que as razões peso de matéria seca/peso de matéria fresca foram significativamente maiores no momento da inoculação e na segunda e terceira semana, não diferindo estatisticamente da primeira e quarta semana. Esta razão, contudo, diminuiu na quinta semana, apresentando resultado inferior e diferindo estatisticamente das demais semanas.

Tabela 2. Valores (Média \pm Desvio Padrão) de pesos de matéria seca e de teores de água de amostras de 200 mg de matéria fresca de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* durante diferentes períodos de cultura *in vitro*. MI = momento da inoculação.

Tempo de cultura (semanas)	Matéria seca (mg)		Teor de água (mg)		Teor de água (%)	
MI	^y 27,8 \pm 1,0	a	^y 172,3 \pm 1,0	c	^y 86,5 \pm 0,5	c
1	24,8 \pm 0,5	b	175,3 \pm 0,5	b	87,6 \pm 0,3	b
2	26,3 \pm 1,3	ab	173,8 \pm 1,3	bc	86,9 \pm 0,6	bc
3	26,5 \pm 1,9	ab	173,5 \pm 0,5	bc	86,8 \pm 1,0	bc
4	24,8 \pm 0,5	b	175,3 \pm 0,5	b	87,6 \pm 0,3	b
5	21,3 \pm 1,0	c	178,8 \pm 1,0	a	89,4 \pm 0,5	a

^y Valores (N=4) da mesma coluna seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

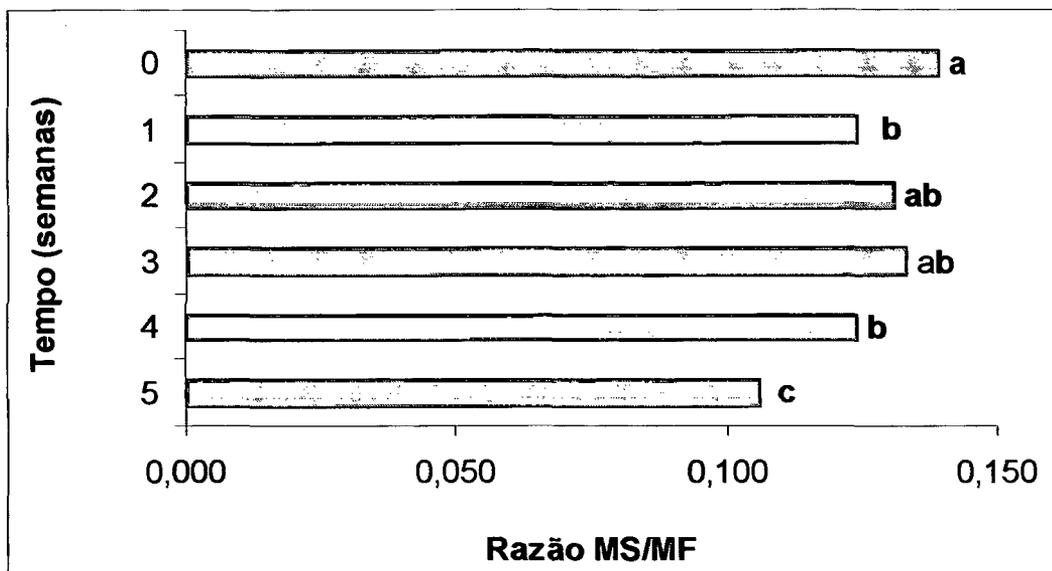


Figura 7. Razão peso de matéria seca (MS)/peso de matéria fresca (MF) de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* durante o período de cultura *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os períodos de cultura pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.1.3. *Freqüência de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento*

A Figura 8 mostra as freqüências de embriões somáticos, em diferentes estágios de desenvolvimento, de culturas embriogênicas de *O. catharinensis*, em função do período de cultura. Observa-se que culturas embriogênicas, após uma semana de cultura, apresentaram a maior freqüência de embriões no estágio globular (88,9%) e uma pequena freqüência de embriões (11,1%) no estágio cotiledonar inicial. Na segunda semana, quando comparada com à primeira, houve uma diminuição na freqüência de embriões somáticos no estágio globular (70,6%) e um aumento na freqüência de embriões somáticos nos estágios cotiledonar inicial (23,9%) e cotiledonar intermediário (5,5%). Na terceira semana, novos embriões somáticos no estágio globular foram formados a partir da embriogênese secundária, sendo observado um aumento não significativo na freqüência destes (74,2%), quando comparada à da segunda semana (70,6%). Entretanto, a freqüência de

embriões somáticos no estágio globular diminuiu significativamente na quarta (51,5 %) e quinta (50,3 %) semanas. Na terceira semana e nas semanas posteriores, houve um aumento significativo na frequência de embriões somáticos no estágio maduro, de 4,6% na quarta semana, para 13,2 % na quinta semana, e um aumento significativo na porcentagem de embriões somáticos no estágio cotiledonar intermediário, entre a terceira e quarta semana. Estes embriões foram provenientes do crescimento dos embriões somáticos inoculados no estágio globular no início da cultura.

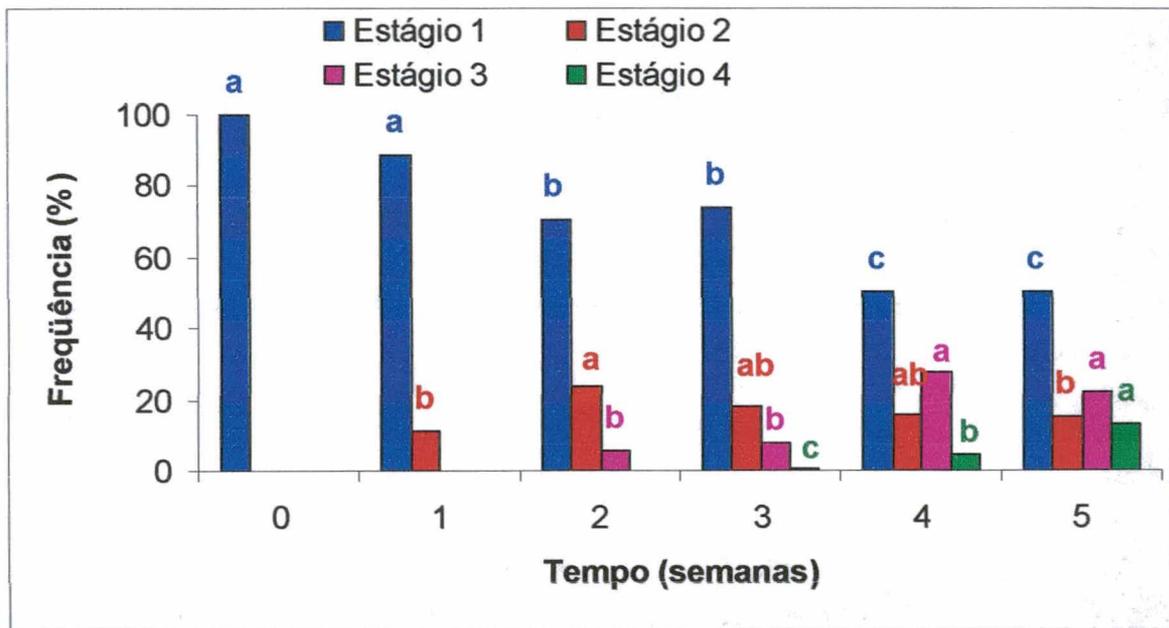


Figura 8. Frequência (%) de embriões somáticos de *O. catharinensis* em diferentes estágios de desenvolvimento durante diferentes períodos de cultura *in vitro*. Estágio 1 = globular; Estágio 2 = cotiledonar inicial; Estágio 3 = cotiledonar intermediário; Estágio 4 = maduro; Semana 0 = momento da inoculação. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas para cada estágio de desenvolvimento durante o período de cultura pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.1.4. Determinação do teor de água e da razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento

Os resultados da Tabela 3 mostram, através da análise de variância, diferenças estatísticas significativas entre os valores de peso de matéria seca de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento, em função do período de cultura *in vitro*. Assim, amostras de 200 mg de matéria fresca de embriões somáticos no estágio globular, no momento de inoculação, apresentaram máximo peso de matéria seca (27,8 mg), não diferindo estatisticamente de embriões somáticos no estágio globular com duas (26,3 mg), três (25,3 mg) e quatro (26,3 mg) semanas de idade. Da mesma forma, não foram detectadas diferenças estatísticas entre os pesos de matéria seca de embriões somáticos nos estágios globular e cotiledonar inicial (27 mg) obtidos de culturas com três semanas de idade. Entretanto, diferenças significativas foram observadas com relação aos pesos de matéria seca de embriões somáticos no estágio globular provenientes de culturas com cinco semanas de idade, os quais apresentaram, em média, 23,5 mg de matéria seca por amostra de 200 mg de matéria fresca. Um decréscimo significativo nos valores de peso de matéria seca foi observado em amostras de embriões somáticos no estágio cotiledonar intermediário com três (23 mg), quatro (23 mg) e cinco (22,5 mg) semanas de idade, e em amostras de embriões somáticos no estágio maduro com quatro (21,5 mg) e cinco (21,8 mg) semanas de idade, não diferindo estatisticamente entre si.

Em relação aos níveis de água presentes nas amostras, foi observado que amostras de embriões no estágio cotiledonar intermediário de culturas embriogênicas com três semanas, e nos estágios cotiledonar intermediário e maduro de culturas com quatro e cinco semanas de idade, bem como amostras de embriões somáticos no estágio globular com cinco semanas de idade, apresentaram valores significativamente maiores de água, não diferindo estatisticamente entre si. Amostras de embriões somáticos no estágio globular, provenientes de culturas embriogênicas no momento da inoculação e com duas, três e quatro semanas de idade, e no estágio cotiledonar inicial, oriundos de culturas embriogênicas com três semanas de idade, apresentaram valores inferiores para quantidade de água, em

torno de 86% do peso da matéria fresca, não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 3).

Tabela 3. Valores (Média \pm Desvio Padrão) de pesos de matéria seca e de teores de água de amostras de 200 mg de matéria fresca de embriões somáticos de *O. catharinensis* em diferentes estágios de desenvolvimento durante diferentes períodos de cultura *in vitro*. Estágio 1 = globular; Estágio 2 = cotiledonar inicial; Estágio 3 = cotiledonar intermediário; Estágio 4 = maduro; MI = momento da inoculação.

Tempo de cultura (semanas)	Estágios	Matéria seca (mg)	Teor de água (mg)	Teor de água (%)
MI	1	^y 27,8 \pm 1,0 a	^y 172,3 \pm 1,0 f	^y 86,1 \pm 0,5 f
1	1	24,8 \pm 0,5 bcd	175,3 \pm 0,5 cde	87,6 \pm 0,3 cde
2	1	26,3 \pm 1,3 abc	173,8 \pm 1,3 def	86,9 \pm 0,6 def
3	1	25,3 \pm 1,5 abcd	174,8 \pm 1,3 cdef	87,4 \pm 0,8 cdef
3	2	27,0 \pm 1,4 ab	173,0 \pm 1,4 ef	86,5 \pm 0,7 ef
3	3	23,0 \pm 1,4 def	177,0 \pm 1,4 abc	88,5 \pm 0,7 abc
4	1	26,3 \pm 0,5 abc	173,8 \pm 0,5 de	86,9 \pm 0,3 de
4	2	24,5 \pm 1,0 bcde	175,5 \pm 1,0 bcde	87,6 \pm 0,5bcde
4	3	23,0 \pm 1,4 def	177,0 \pm 1,4 abc	88,5 \pm 0,7 abc
4	4	21,5 \pm 1,3 f	178,5 \pm 1,3 a	89,3 \pm 0,7 a
5	1	23,5 \pm 0,6 cdef	176,0 \pm 0,6 abcd	88,3 \pm 0,3abcd
5	2	24,5 \pm 0,6 bcde	175,5 \pm 0,6 bcde	87,8 \pm 0,3bcde
5	3	22,5 \pm 1,3 def	177,5 \pm 1,3 abc	88,8 \pm 0,7 abc
5	4	21,8 \pm 1,5 ef	178,3 \pm 1,5 ab	89,1 \pm 0,8 ab

^y Valores (N=4) da mesma coluna seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

A Figura 9 indica que valores máximos para razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca foram observados em amostras de embriões somáticos no estágio globular, provenientes de culturas embriogênicas no momento da inoculação e com duas, três e quatro semanas de idade, e para amostras de embriões somáticos no estágio cotiledonar inicial, obtidos de culturas embriogênicas com três semanas de idade, não diferindo estatisticamente entre si. Esta razão diminuiu significativamente

nos embriões somáticos em função do estágio de desenvolvimento e do período de cultura. A menor razão (0,108) foi observada para amostras de embriões somáticos no estágio maduro, oriundos de culturas com quatro semanas de idade, não diferindo estatisticamente de embriões somáticos no estágio cotiledonar intermediário, de culturas com três e quatro semanas de idade, e de embriões somáticos nos estágios globular, cotiledonar inicial e maduro, de culturas embriogênicas com cinco semanas de idade.

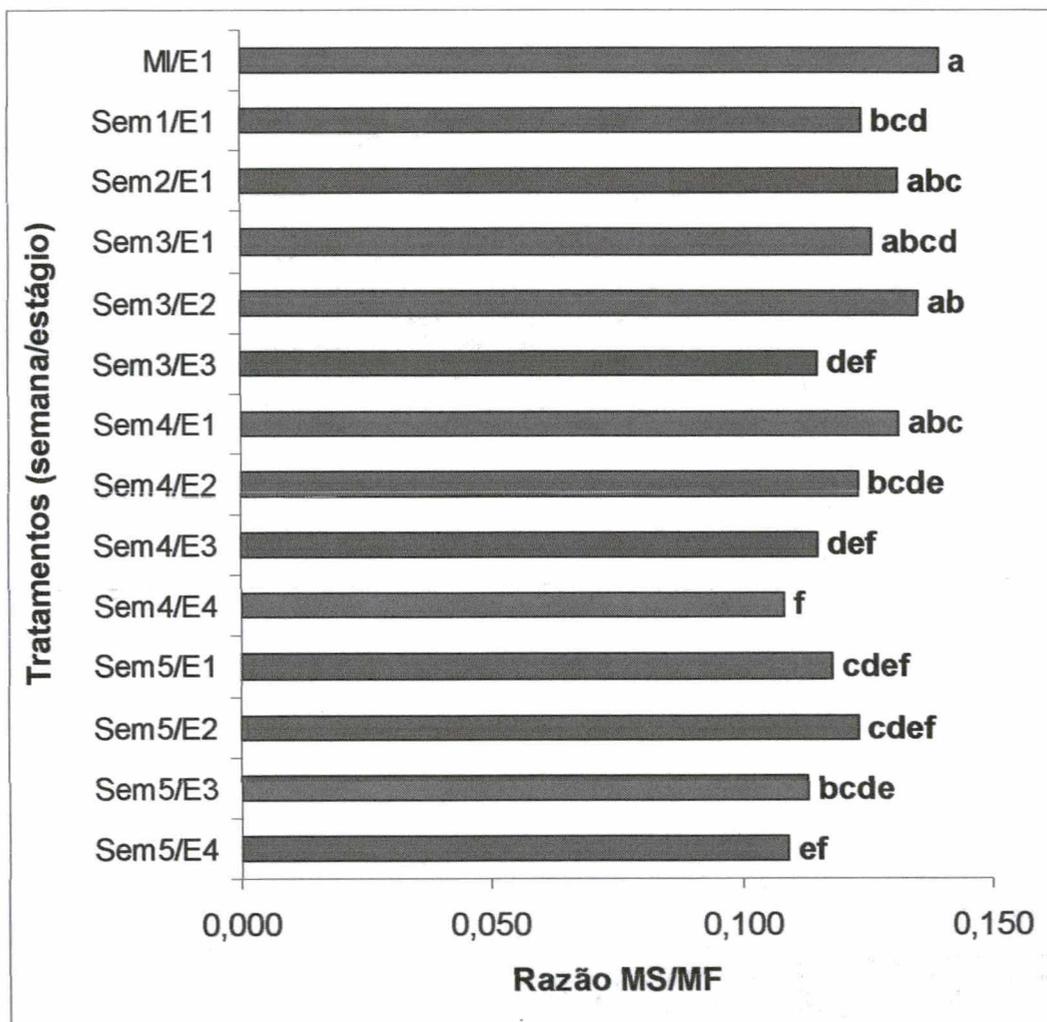


Figura 9. Razão peso de matéria seca (MS)/peso de matéria fresca (MF) de embriões somáticos de *O. catharinensis* em diferentes períodos de cultura *in vitro* e estágios de desenvolvimento. Sem = semana; Ml = momento da inoculação; E1 = Estágio globular; E2 = Estágio cotiledonar inicial; E3 = Estágio cotiledonar intermediário; E4 = Estágio maduro. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.2. Avaliação do potencial de embriogênese secundária de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento durante a subcultura de culturas embriogênicas

4.2.1. Oxidação das culturas embriogênicas

A Figura 10 mostra as porcentagens de oxidação, no decorrer do tempo, de culturas embriogênicas iniciadas com embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento. Os resultados indicam que as culturas embriogênicas iniciadas com embriões somáticos no estágio globular apresentaram taxa significativamente menor de oxidação durante 30 dias de cultura *in vitro*, atingindo 6,25 % após 13 dias de cultura, enquanto que as culturas embriogênicas iniciadas a partir de embriões somáticos no estágio maduro apresentaram taxa significativamente maior de oxidação, com 80% das culturas oxidadas após 25 dias de cultura *in vitro*.

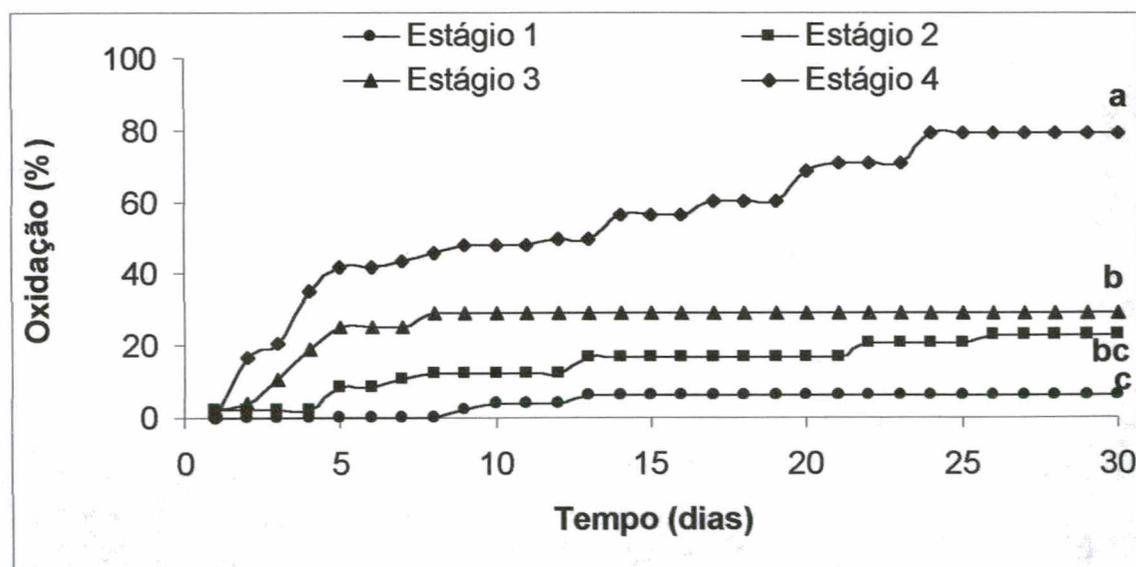


Figura 10. Frequência (%) de oxidação de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* iniciadas a partir de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento durante o período de cultura *in vitro*. Estágio 1 = globular; Estágio 2 = cotiledonar inicial; Estágio 3 = cotiledonar intermediário; Estágio 4 = maduro. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.2.2. Crescimento de culturas embriogênicas

Os valores de pesos das matérias fresca e seca das culturas iniciadas a partir da inoculação de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento são mostrados na Tabela 4. Os dados indicam que crescimentos significativamente maiores em matéria fresca e seca das culturas embriogênicas, foram obtidos com a inoculação de embriões somáticos no estágio globular, com aumento de 697 mg de matéria fresca e 73,1 mg de matéria seca, diferindo estatisticamente dos demais estágios. Nos experimentos em que as culturas foram iniciadas com embriões somáticos nos estágios cotiledonar inicial, cotiledonar intermediário e maduro, foram observados valores significativamente menores, sendo que culturas embriogênicas, provenientes da inoculação de embriões somáticos no estágio maduro mostraram os menores valores de matéria fresca e matéria seca, com 57 e 3,7 mg, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais estágios.

Diferenças significativas entre os valores da razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca foram observadas apenas entre as culturas iniciadas com embriões somáticos no estágio cotiledonar inicial e as obtidas a partir de embriões somáticos no estágio cotiledonar intermediário (Figura 11), sendo significativamente menor neste último caso.

Tabela 4. Valores (Média \pm Desvio Padrão) de crescimento em matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* iniciadas com embriões somáticos nos estágios globular (1), cotiledonar inicial (2), cotiledonar intermediário (3) e maduro (4). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*.

Estágios inoculados	Crescimento em MF (mg)	Crescimento em MS (mg)
1	^y 697,0 \pm 56,0 a	^y 73,1 \pm 5,0 a
2	433,7 \pm 66,0 b	48,4 \pm 6,0 b
3	177,0 \pm 14,0 c	17,3 \pm 6,0 c
4	57,0 \pm 6,0 d	3,7 \pm 0,9d

^y Valores (N=5) da mesma coluna seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

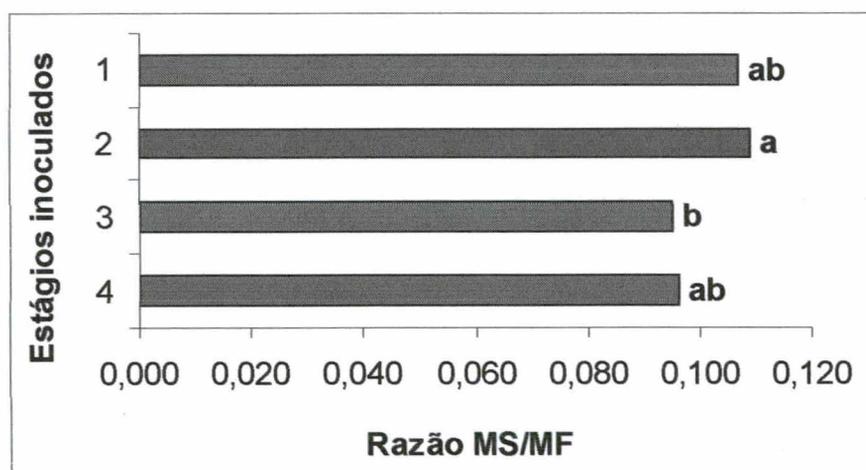


Figura 11. Razão peso de matéria seca (MS)/peso de matéria fresca (MF) de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* iniciadas a partir da inoculação de embriões somáticos nos estágios globular (1), cotiledonar inicial (2), cotiledonar intermediário (3) e maduro (4). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.2.3. *Freqüência de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento*

As freqüências de embriões somáticos nos diferentes estágios de desenvolvimento, produzidos por culturas embriogênicas iniciadas a partir da inoculação de embriões somáticos nos estágios globular, cotiledonar inicial, cotiledonar intermediário e maduro são apresentadas na Tabela 5. Observa-se que as culturas iniciadas com embriões somáticos no estágio globular apresentaram, no final de quatro semanas de cultura, embriões somáticos nos quatro estágios de desenvolvimento. A maior freqüência de embriões somáticos no estágio globular (58,4%) ocorreu quando as culturas foram iniciadas com embriões somáticos no estágio globular. Neste caso, apenas 3,2 % dos embriões somáticos estavam no estágio maduro. Quando as culturas foram iniciadas com embriões somáticos no estágio cotiledonar inicial, ocorreu uma diminuição na freqüência de embriões somáticos no estágio globular (18,3%), a qual não diferiu estatisticamente de embriões somáticos nos estágios cotiledonar inicial (16,9%) e maduro (10,2%). Porém, foi observado um aumento na freqüência de embriões somáticos no estágio cotiledonar intermediário (54,7%), diferindo estatisticamente dos demais estágios. As culturas iniciadas com embriões somáticos no estágio cotiledonar intermediário não apresentaram embriões somáticos nos estágios globular e maduro, sendo observados somente embriões somáticos nos estágios cotiledonar inicial (23,5%) e cotiledonar intermediário (76,5%). Ao inocular embriões somáticos no estágio maduro, foi observado que as culturas apresentaram 100 % de embriões neste estágio.

Tabela 5. Frequência (%) (Média \pm Desvio Padrão) de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento presentes em culturas embriogênicas de *O. catharinensis* iniciadas a partir da inoculação de embriões somáticos nos estágios globular (1), cotiledonar inicial (2), cotiledonar intermediário (3) e maduro (4). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*.

Estágios inoculados	Estágios de desenvolvimento			
	1	2	3	4
1	^y 58,4 \pm 4,3 a	^y 21,4 \pm 2,6 b	^y 24,0 \pm 5,0 b	^y 3,2 \pm 1,8 c
2	18,3 \pm 10,3 b	16,9 \pm 6,9 b	54,7 \pm 5,6 a	10,2 \pm 4,1 b
3	0 \pm 0 c	23,5 \pm 13,4 b	76,5 \pm 13,4 a	0 \pm 0 c
4	0 \pm 0 b	0 \pm 0 b	0 \pm 0 b	100 \pm 0 a

^y Valores são proporções de 5 repetições de 8 embriões somáticos. As médias da mesma linha seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.2.4. Crescimento dos embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento

Os valores de pesos de matéria fresca e seca obtidos para embriões somáticos nos diferentes estágios, produzidos a partir da inoculação de embriões somáticos nos estágios globular, cotiledonar inicial, cotiledonar intermediário e maduro são apresentados nas Tabelas 6 e 7. Os dados indicam que, nas culturas iniciadas com embriões somáticos no estágio globular, os valores da matéria fresca e seca foram significativamente maiores para os embriões no estágio cotiledonar intermediário, sendo, respectivamente, de 440 mg e 48 mg, diferindo estatisticamente dos valores obtidos para os embriões nos demais estágios de desenvolvimento. Nas culturas iniciadas com embriões somáticos no estágio cotiledonar inicial, os embriões somáticos no estágio cotiledonar intermediário também apresentaram maior peso da matéria fresca, com 258 mg, diferindo estatisticamente dos demais estágios. Estes embriões também apresentaram maior peso da matéria seca, com 29 mg, não diferindo, entretanto, dos valores de matéria seca obtidos para os embriões somáticos no estágio maduro, com 21 mg. Ao iniciar culturas com embriões somáticos do estágio cotiledonar intermediário, foram observados maiores pesos de matéria fresca e de matéria seca para os embriões somáticos no estágio cotiledonar intermediário, com 444 mg e 43 mg, respectivamente, diferindo estatisticamente dos valores obtidos para os demais estágios. Quando as culturas foram iniciadas com embriões somáticos do estágio maduro, foram observados valores de 727 mg de matéria fresca e 63 mg de matéria seca apenas para este estágio de embriões somáticos.

A Tabela 8 mostra os valores da razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca em culturas embriogênicas produzidas por embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento. Observa-se que houve uma tendência dos embriões somáticos nos estágios cotiledonar intermediário e maduro apresentarem os maiores valores, independentemente dos estágios dos embriões somáticos utilizados para iniciar as culturas.

Tabela 6. Valores (Média \pm Desvio Padrão) de pesos de matéria fresca (mg) de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento, produzidos por culturas embriogênicas de *O. catharinensis* iniciadas a partir da inoculação de embriões somáticos nos estágios globular (1), cotiledonar inicial (2), cotiledonar intermediário (3) e maduro (4). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*.

Estágios inoculados	Estágios de desenvolvimento			
	1	2	3	4
1	^y 50 \pm 20 a	^y 112 \pm 6 b	^y 440 \pm 6 a	^y 114 \pm 76 b
2	6 \pm 0 d	19 \pm 9 c	258 \pm 71 a	205 \pm 84 b
3	0 \pm 0 b	24 \pm 13 b	444 \pm 33 a	19 \pm 42 b
4	0 \pm 0 b	0 \pm 0 b	0 \pm 0 b	727 \pm 55 a

^y Valores (N=5) da mesma linha seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 7. Valores (Média \pm Desvio Padrão) de pesos de matéria seca (mg) de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento, produzidos por culturas embriogênicas de *O. catharinensis* iniciadas a partir da inoculação de embriões somáticos nos estágios globular (1), cotiledonar inicial (2), cotiledonar intermediário (3) e maduro (4). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*.

Estágio inoculado	Estágios de desenvolvimento			
	1	2	3	4
1	^y 4 \pm 2 c	^y 11 \pm 7 b	^y 48 \pm 5 a	^y 12 \pm 8 b
2	1 \pm 0 b	2 \pm 1 b	29 \pm 9 a	21 \pm 7 a
3	0 \pm 0 b	2 \pm 1 b	43 \pm 3 a	2 \pm 4 b
4	0 \pm 0 b	0 \pm 0 b	0 \pm 0 b	63 \pm 8 a

^y Valores (N=5) da mesma linha seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 8. Razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca (Média \pm Desvio Padrão) de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento, produzidos por culturas embriogênicas de *O. catharinensis* iniciadas a partir da inoculação de embriões somáticos nos estágios globular (1), cotiledonar inicial (2), cotiledonar intermediário (3) e maduro (4). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*.

Estágio inoculado	Estágios de desenvolvimento			
	1	2	3	4
1	$^y 0,070 \pm 0,004$ c	$^y 0,090 \pm 0,009$ b	$^y 0,108 \pm 0,004$ a	$^y 0,105 \pm 0,003$ a
2	$0,099 \pm 0,068$ b	$0,083 \pm 0,036$ b	$0,116 \pm 0,003$ a	$0,104 \pm 0,006$ b
3	$0,000 \pm 0,000$ c	$0,067 \pm 0,003$ b	$0,096 \pm 0,003$ a	$0,096 \pm 0,048$ a
4	$0,000 \pm 0,000$ b	$0,000 \pm 0,000$ b	$0,000 \pm 0,000$ b	$0,084 \pm 0,005$ a

^y Valores (N=5) da mesma linha seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.3. Avaliação do efeito do sorbitol e do carvão ativado na oxidação, crescimento, teor de água e razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca de culturas embriogênicas

4.3.1. Oxidação das culturas embriogênicas

A Figura 12 mostra que as culturas embriogênicas produzidas em meio de cultura sem sorbitol e carvão ativado apresentaram a maior taxa de oxidação, diferindo significativamente de culturas embriogênicas produzidas em meio de cultura contendo 11 g.L⁻¹ de sorbitol, e de culturas embriogênicas produzidas em meio de cultura contendo 0, 2,75 e 5,5 g.L⁻¹ de sorbitol e 3 g.L⁻¹ de carvão ativado.

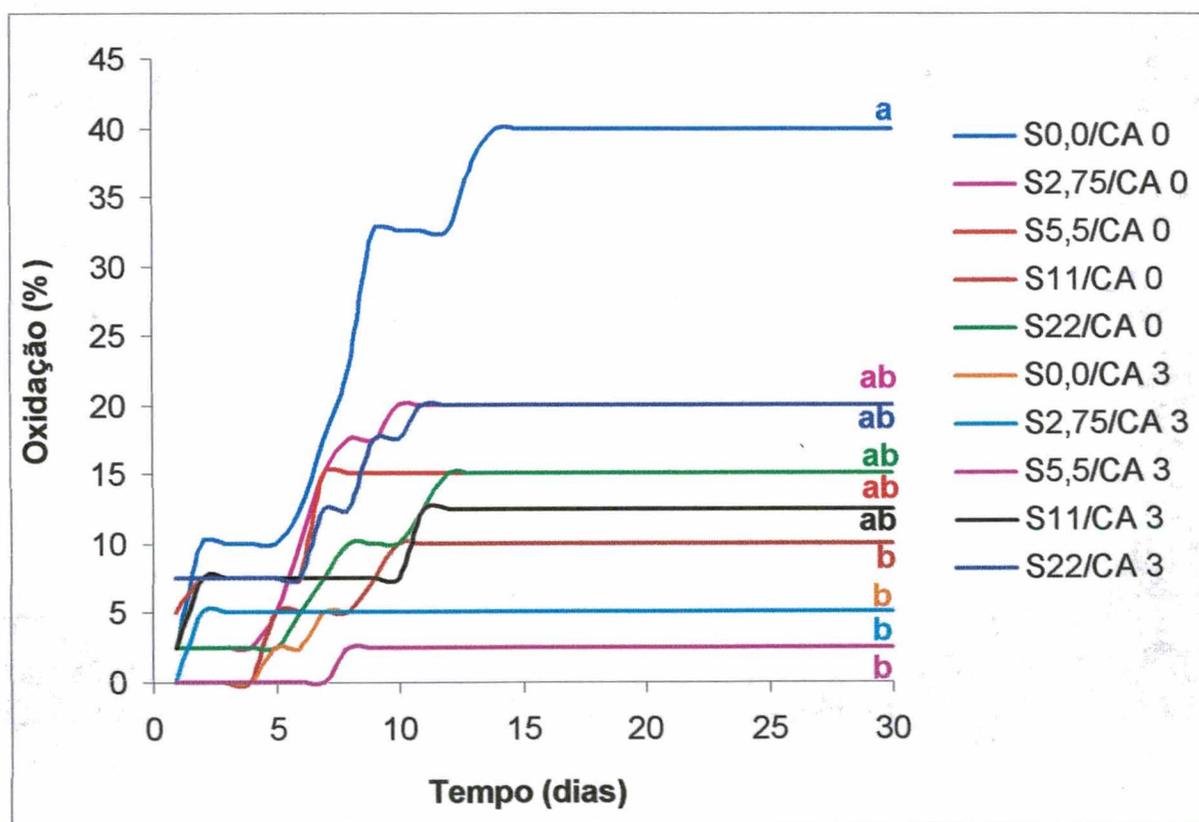


Figura 12. Efeito das concentrações de sorbitol (0; 2,75; 5,5; 11 e 22 g.L⁻¹) e do carvão ativado (0 e 3 g.L⁻¹) sobre a frequência (%) de oxidação de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* durante diferentes períodos de cultura *in vitro*. S = sorbitol; CA = carvão ativado. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.3.2. Crescimento das culturas embriogênicas

A Tabela 9 mostra os valores de crescimento, em termos de matéria fresca e seca, obtidos para as culturas embriogênicas produzidas em diferentes concentrações de sorbitol, na presença ou ausência de carvão ativado. A suplementação do meio de cultura com concentrações de sorbitol entre 0 e 11 g.L⁻¹ promoveu o incremento em matéria fresca das culturas embriogênicas, apresentando resultados significativamente superiores. Valores inferiores para o peso de matéria fresca foram observados quando culturas embriogênicas foram produzidas em meio de cultura suplementado apenas com 22 g.L⁻¹ de sorbitol e com concentrações de sorbitol entre 0 a 22 g.L⁻¹ combinadas com carvão ativado. Resultado semelhante foi observado para o incremento de matéria seca, na qual culturas embriogênicas produzidas em meio de cultura suplementado com 11 g.L⁻¹ de sorbitol apresentaram valores superiores, não diferindo estatisticamente das concentrações entre 0 e 5,5 g.L⁻¹.

A Tabela 10 indica que as culturas embriogênicas produzidas em meio de cultura suplementado com menores concentrações de sorbitol, na presença ou não de carvão ativado, apresentaram os maiores níveis de água, enquanto que culturas embriogênicas provenientes do meio de cultura com a maior concentração de sorbitol, na presença e ausência de carvão ativado, apresentaram os menores níveis de água, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

Ao analisar os valores da razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca (Figura 13) verifica-se que culturas embriogênicas oriundas do meio de cultura suplementado com 22 g.L⁻¹ de sorbitol, na ausência e presença de carvão ativado, apresentaram valores máximos, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

Tabela 9. Valores (Média \pm Desvio Padrão) de crescimento em matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* mantidas em meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de sorbitol (0; 2,75; 5,5; 11 e 22 g.L⁻¹) e de carvão ativado (0 e 3 g.L⁻¹). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*.

Sorbitol (g.L ⁻¹)	carvão ativado (g.L ⁻¹)	Crescimento em MF (mg)	Crescimento em MS (mg)
0,0	0	^y 574,4 \pm 86,3 a	^y 37,1 \pm 5,3 bcd
2,75	0	670,4 \pm 73,0 a	43,8 \pm 5,6 abc
5,5	0	648,1 \pm 91,4 a	46,3 \pm 5,0 ab
11	0	634,3 \pm 84,2 a	49,9 \pm 5,1 a
22	0	358,9 \pm 74,9 b	36,1 \pm 8,2 cd
0,0	3	361,4 \pm 86,6 b	23,9 \pm 6,2 e
2,75	3	362,9 \pm 61,8 b	25,6 \pm 5,4 e
5,5	3	385,1 \pm 49,2 b	29,0 \pm 3,6 de
11	3	384,8 \pm 83,4 b	32,6 \pm 6,9 de
22	3	310,3 \pm 48,8 b	30,8 \pm 5,0 de

^y Valores (N=8) da mesma coluna seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 10. Valores (Média \pm Desvio Padrão) de teores de água de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* mantidas em meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de sorbitol (0; 2,75; 5,5; 11 e 22 g.L⁻¹) e de carvão ativado (0 e 3 g.L⁻¹). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*.

Sorbitol (g.L ⁻¹)	carvão ativado (g.L ⁻¹)	Teor de água (mg)	Teor de água (%)
0,0	0	^y 563,5 \pm 81,7 a	^y 93,3 \pm 0,5 a
2,75	0	652,9 \pm 67,8 a	93,3 \pm 0,4 a
5,5	0	628,0 \pm 87,1 a	92,7 \pm 0,5 abc
11	0	610,6 \pm 79,2 a	92,0 \pm 0,3 cd
22	0	349,0 \pm 67,2 b	89,9 \pm 0,7 e
0,0	3	363,8 \pm 81,0 b	93,1 \pm 0,7 ab
2,75	3	363,5 \pm 56,9 b	92,7 \pm 0,6 abc
5,5	3	382,3 \pm 46,3 b	92,3 \pm 0,5 bcd
11	3	378,4 \pm 76,9 b	91,4 \pm 0,5 d
22	3	305,8 \pm 44,6 b	90,0 \pm 0,8 e

^y Valores (N=8) da mesma coluna seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

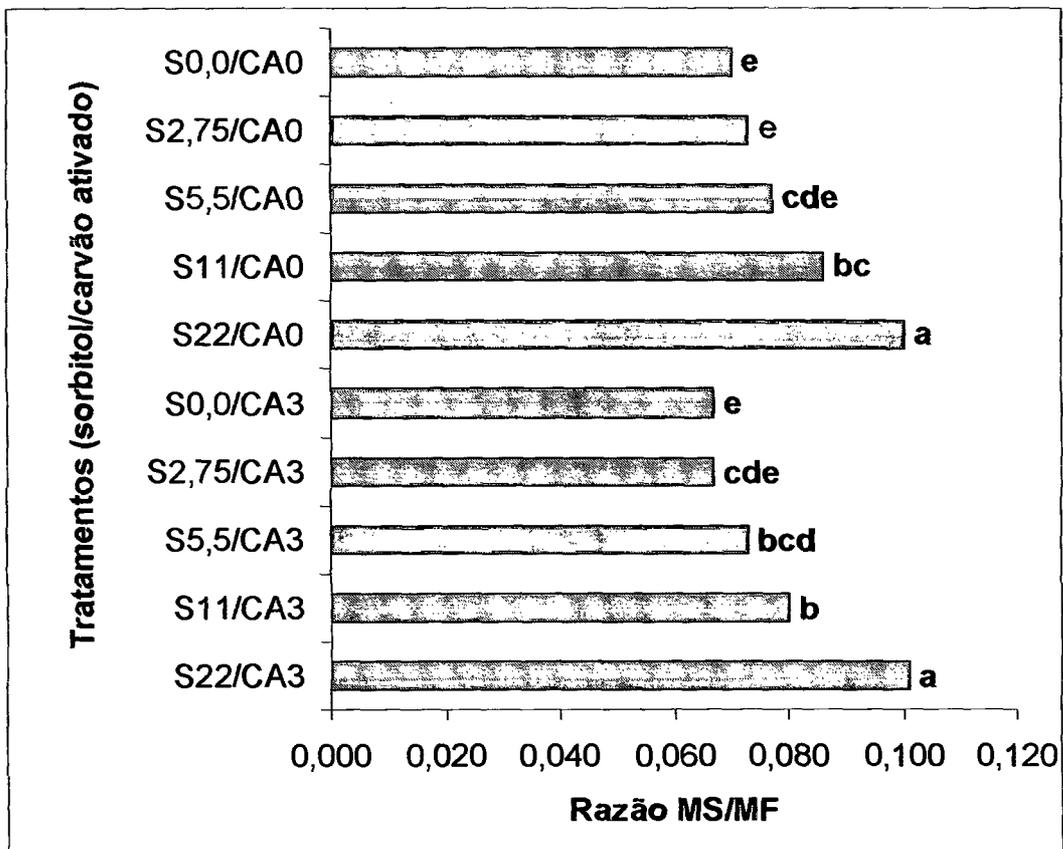


Figura 13. Razão peso de matéria seca (MS)/peso de matéria fresca (MF) de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* produzidas em meios de cultura contendo diferentes concentrações de sorbitol (0, 2,75; 5,5; 11 e 22 g.L⁻¹) e de carvão ativado (0 e 3 g.L⁻¹). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*. S = sorbitol; CA = Carvão ativado. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.3.3. Determinação do teor de água em culturas embriogênicas

Os resultados apresentados na Tabela 11 indicam que amostras de 200 mg de matéria fresca, obtidas de culturas embriogênicas produzidas em meios contendo diferentes concentrações de sorbitol, na presença ou ausência de carvão ativado, apresentaram diferenças estatísticas significativas para os pesos da matéria seca. A concentração de sorbitol de 22 g.L⁻¹ promoveu significativamente o crescimento em matéria seca, independente da presença do carvão ativado.

Tabela 11. Valores (Média ± Desvio Padrão) de pesos de matéria seca para amostras de 200 mg de matéria fresca, de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* mantidas em meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de sorbitol (0; 2,75; 5,5; 11 e 22 g.L⁻¹) e de carvão ativado (0 e 3 g.L⁻¹). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*.

Sorbitol (g.L ⁻¹)	Carvão ativado (g.L ⁻¹)	Matéria seca (mg)
0,0	0	^y 13,3±1,0 cd
2,75	0	13,4±0,8 cd
5,5	0	14,6±1,0bcd
11	0	16,0±0,7 b
22	0	20,2±1,5 a
0,0	3	14,1±1,5 cd
2,75	3	14,6±1,1 d
5,5	3	15,5±1,1 bcd
11	3	17,2±1,0 bc
22	3	19,9±1,0 a

^y Valores (N=8) da mesma coluna seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.3.4. Frequência de embriões somáticos

O efeito das concentrações de sorbitol e da ausência ou presença de carvão ativado sobre a frequência de embriões somáticos, nos diferentes estágios de desenvolvimento, em culturas embriogênicas de *O. catharinensis*, são mostrados na Tabela 12. As concentrações de sorbitol juntamente com carvão ativado tiveram efeito promotor sobre a frequência de embriões somáticos no estágio globular. Desta forma, as maiores frequências de embriões somáticos neste estágio foram observadas em culturas embriogênicas provenientes do meio de cultura suplementado com 2,75, 5,5, 11 e 22 g.L⁻¹ de sorbitol em combinação com carvão ativado (3 g.L⁻¹), não diferindo estatisticamente entre si. O meio de cultura com 2,75 g.L⁻¹ de sorbitol sem carvão ativado apresentou resultado significativamente inferior, diferindo dos demais tratamentos. Culturas embriogênicas crescidas em meio de cultura suplementado com 2,75 g.L⁻¹ de sorbitol e em meio somente com carvão ativado (3 g.L⁻¹) sem sorbitol, apresentaram resultados significativamente superiores para a frequência de embriões somáticos no estágio cotiledonar inicial, não diferindo estatisticamente do meio de cultura suplementado com 11 g.L⁻¹ de sorbitol. As maiores frequências de embriões somáticos no estágio cotiledonar intermediário foram observadas em culturas embriogênicas crescidas em meio de cultura contendo concentrações de sorbitol entre 0 e 11 g.L⁻¹ sem a adição de carvão ativado, não diferindo estatisticamente entre si. As maiores frequências de embriões somáticos no estágio maduro foram observadas em culturas embriogênicas oriundas do meio de cultura suplementado com 5,5 g.L⁻¹ de sorbitol sem carvão ativado, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

Tabela 12. Efeito das concentrações de sorbitol e do carvão ativado sobre a frequência (%) (Média \pm Desvio Padrão) de embriões somáticos de *Ocotea catharinensis* nos diferentes estágios de desenvolvimento: globular (1), cotiledonar inicial (2), cotiledonar intermediário (3) e maduro (4). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*.

Sorbitol (g.L ⁻¹)	Carvão ativado (g.L ⁻¹)	Estágios de desenvolvimento			
		1	2	3	4
0,0	0	^y 55,3 \pm 5,1 cd	^y 19,4 \pm 2,7 b	^y 21,4 \pm 3,9 ab	^y 3,9 \pm 1,0 bc
2,75	0	45,3 \pm 1,9 e	26,5 \pm 2,4 a	23,3 \pm 3,6 a	4,8 \pm 0,9 b
5,5	0	54,7 \pm 4,8 cd	19,0 \pm 3,4 bc	19,3 \pm 2,7 ab	7,0 \pm 1,6 a
11	0	53,7 \pm 2,2 d	21,6 \pm 2,8 ab	19,7 \pm 2,7 ab	4,9 \pm 1,1 b
22	0	60,5 \pm 1,4 bc	17,7 \pm 1,5 bcd	17,0 \pm 2,4 bcd	4,8 \pm 0,8 b
0,0	3	55,8 \pm 3,2 cd	24,8 \pm 4,3 a	17,2 \pm 1,7 bc	2,2 \pm 1,0 c
2,75	3	69,7 \pm 2,6 a	18,6 \pm 2,4 bc	9,6 \pm 1,8 e	2,1 \pm 0,8 c
5,5	3	68,4 \pm 3,0 a	16,9 \pm 2,6 bc	12,4 \pm 1,6 de	2,4 \pm 0,8 c
11	3	70,1 \pm 1,7 a	14,0 \pm 1,8 c	12,8 \pm 2,1 cde	3,1 \pm 0,5 bc
22	3	65,7 \pm 4,1 ab	17,0 \pm 2,9 bc	14,4 \pm 1,8 bcd	3,3 \pm 1,1 bc

^y Valores são proporções de 8 repetições de 12 embriões somáticos. As médias da mesma coluna seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.4. Efeito da desidratação lenta de embriões somáticos na redução da matéria fresca

4.4.1. Curva de redução da matéria fresca

Os valores de pesos de matéria fresca de embriões somáticos durante diferentes períodos de desidratação são mostrados na Figura 14. Observa-se que o peso de matéria fresca diminuiu significativamente do dia 0 até o quarto dia de desidratação. Embriões somáticos sem desidratar (dia 0) apresentaram maior peso de matéria fresca, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Os embriões somáticos no terceiro e quarto dias de desidratação apresentaram os menores valores para peso de matéria fresca, não diferindo significativamente entre si.

A Figura 15 mostra as taxas de redução em matéria fresca em mg.dia^{-1} apresentadas pelos embriões somáticos. A maior taxa de redução em matéria fresca (232 mg.dia^{-1}) ocorreu nos embriões somáticos no primeiro dia de desidratação, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. A partir do segundo dia, ocorreu uma diminuição nas taxas de redução da matéria fresca, respectivamente de 80, 60 e 50 mg.dia^{-1} , não diferindo estatisticamente dos valores observados para o terceiro e quarto dia de desidratação.

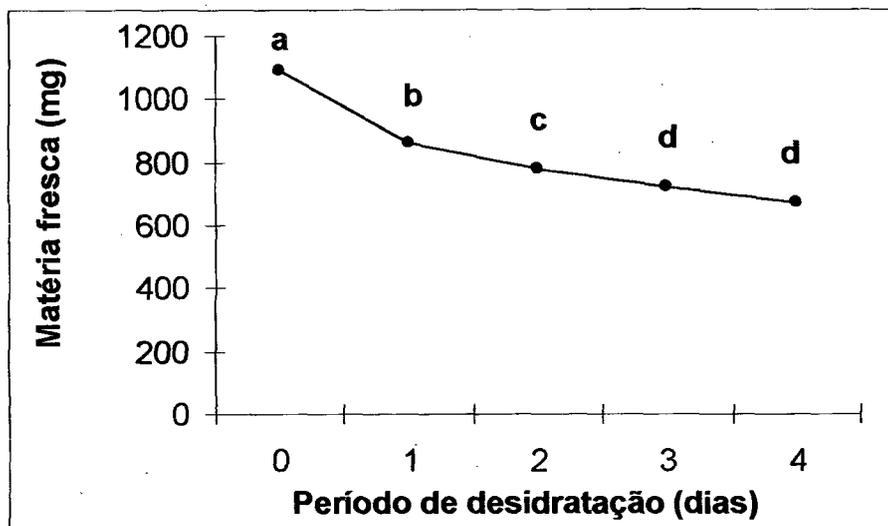


Figura 14. Pesos de matéria fresca (mg) em embriões somáticos de *O. catharinensis* no estágio maduro, durante diferentes períodos de desidratação. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os períodos de desidratação pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

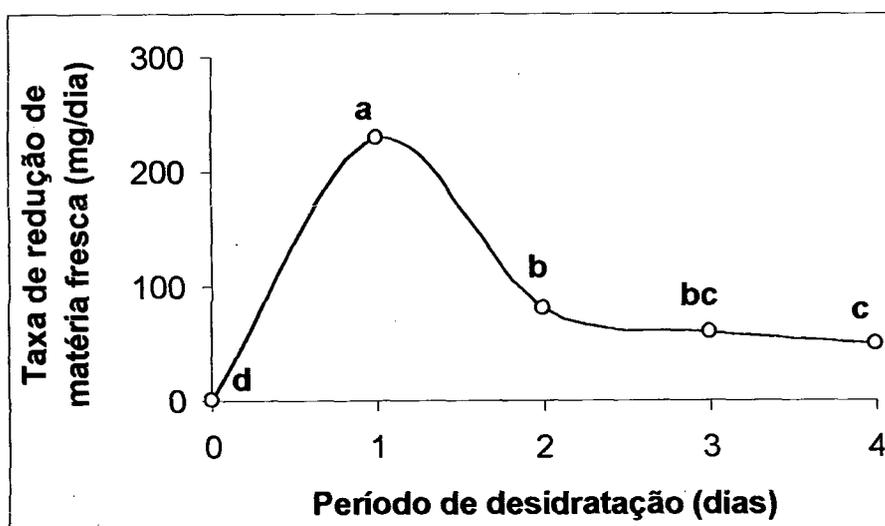


Figura 15. Redução da matéria fresca de embriões somáticos maduros de *O. catharinensis* durante diferentes períodos de desidratação. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os períodos de desidratação pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.4.2. Determinação dos pesos de matéria seca

Os valores de pesos da matéria seca obtidos a partir de amostras de 200 mg de matéria fresca de embriões somáticos em diferentes períodos de desidratação são mostrados na Tabela 13. Verifica-se que a partir do primeiro dia de desidratação, os pesos de matéria seca aumentaram nas amostras de 200 mg de matéria fresca, de forma que amostras de embriões somáticos com quatro dias de desidratação apresentaram valores significativamente maiores (24,3 mg de matéria seca/200 mg de matéria fresca).

Tabela 13. Valores (Média \pm Desvio Padrão) de pesos de matéria seca de amostras de 200 mg de matéria fresca, de embriões somáticos maduros de *O. catharinensis*, durante diferentes períodos de desidratação.

Período de desidratação (dias)	Matéria seca (mg)
0	^y 21,3 \pm 0,6 b
1	22,0 \pm 1,0 ab
2	22,3 \pm 1,2 ab
3	23,0 \pm 1,0 ab
4	24,3 \pm 1,0 a

^y Valores (N=3) da mesma coluna seguidos por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.5. Determinação dos níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido

4.5.1. Níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em culturas embriogênicas

A partir dos dados apresentados na Tabela 2 (item 4.1.2), ou seja, quantidade de matéria seca presente em 200 mg de matéria fresca de culturas embriogênicas em diferentes idades, foi possível o cálculo das concentrações de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido por grama (g) de matéria seca.

A Figura 16 mostra os dados obtidos para as concentrações de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido, em mg.g^{-1} de matéria seca, em culturas embriogênicas no momento da inoculação e durante o período de 1 a 5 semanas de cultura *in vitro*. A análise de variância indicou diferenças estatísticas significativas para os níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido entre os diferentes períodos de cultura. As culturas embriogênicas com uma e duas semanas de idade apresentaram níveis significativamente superiores de proteínas totais, 103,9 e 97,7 mg.g^{-1} de matéria seca, respectivamente, diferindo significativamente das concentrações observadas para as demais semanas. Houve um decréscimo nos níveis de proteínas totais com o tempo de cultura. Assim, culturas embriogênicas com quatro e cinco semanas de idade apresentaram níveis reduzidos de proteínas totais, 38,8 e 36,3 mg.g^{-1} de matéria seca, respectivamente, não diferindo estatisticamente.

Os níveis de açúcares solúveis totais nas culturas embriogênicas aumentaram significativamente, de 127,3 mg.g^{-1} de matéria seca no momento da inoculação, para 276 mg.g^{-1} de matéria seca na primeira semana. Houve um decréscimo significativo nos níveis de açúcares solúveis totais em culturas embriogênicas com três, quatro e cinco semanas de idade, 173,2, 162,4 e 183,2 mg.g^{-1} de matéria seca, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si.

Os níveis de amido aumentaram com o período de cultura *in vitro*. Assim, culturas embriogênicas com três, quatro e cinco semanas de idade apresentaram resultados significativamente superiores, variando entre 339,7 a 354,5 mg.g^{-1} de

matéria seca, não diferindo estatisticamente entre si. Foi observado um decréscimo nos níveis de amido em culturas embriogênicas no momento da inoculação até a primeira semana de 261,2 para 153 mg.g⁻¹ de matéria seca, e aumentos significativos nos níveis de amido da primeira semana até a terceira semana de 153,0 para 346,6 mg.g⁻¹ de matéria seca, diferindo estatisticamente entre si.

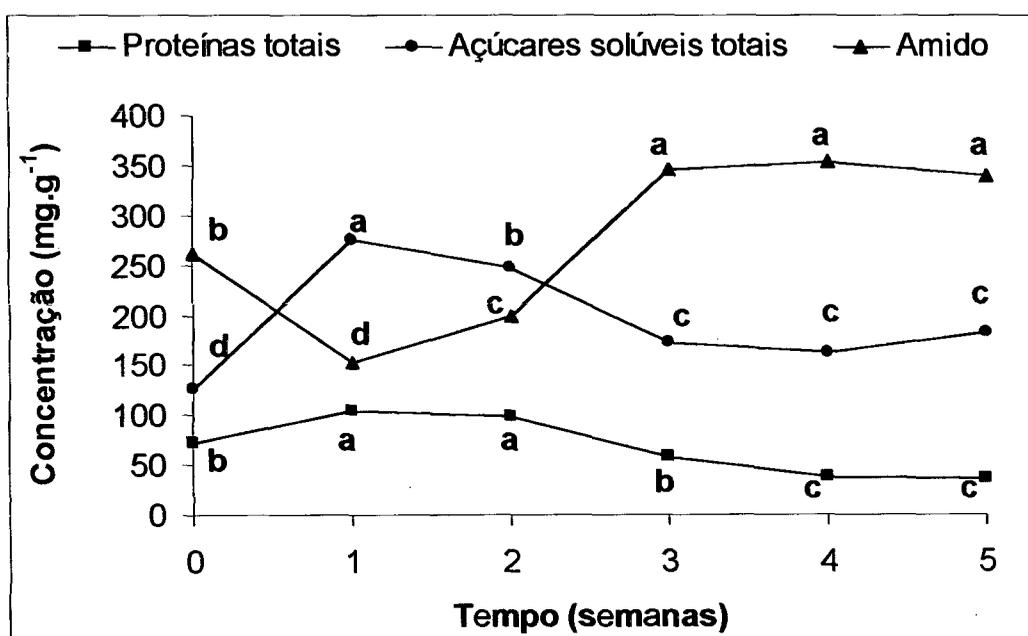


Figura 16. Níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido (em mg.g⁻¹ de matéria seca) em culturas embriogênicas de *O. catharinensis* durante diferentes períodos de cultura *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os períodos de cultura pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.5.2. Níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento

A partir dos dados apresentados na Tabela 3 (item 4.1.4), foi possível o cálculo das concentrações de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido por g de matéria seca. A Figura 17 mostra diferenças estatísticas significativas entre os níveis de proteínas totais de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento. Embriões somáticos no estágio globular, obtidos de culturas embriogênicas com três semanas de idade, apresentaram níveis superiores de proteínas totais, diferindo estatisticamente dos demais estágios. Além disso, houve uma tendência dos embriões somáticos no estágio globular apresentarem níveis significativamente superiores de proteínas totais em relação aos embriões somáticos nos estágios cotiledonar inicial, cotiledonar intermediário e maduro.

Pela Figura 18, verifica-se que níveis significativamente superiores de açúcares solúveis totais foram observados em embriões somáticos no estágio globular de culturas embriogênicas com uma semana de idade, não diferindo estatisticamente dos valores obtidos para os embriões somáticos no estágio cotiledonar intermediário de culturas embriogênicas com três semanas de idade. Com exceção dos embriões somáticos no estágio globular nas culturas recém iniciadas, os embriões somáticos nos estágios globular e cotiledonar inicial provenientes de culturas embriogênicas com duas e três semanas de idade apresentaram maiores níveis de açúcares solúveis totais. Também foi possível constatar que nas culturas com quatro e cinco semanas de idade, as concentrações de açúcares solúveis totais tenderam a aumentar significativamente nos embriões somáticos em função dos estágios de desenvolvimento.

A Figura 19 indica que embriões somáticos nos estágios cotiledonar intermediário e maduro de culturas embriogênicas com quatro semanas de idade, apresentaram níveis significativamente superiores de amido, diferindo estatisticamente dos demais estágios, indicando assim, uma tendência em haver níveis maiores de amido em embriões mais desenvolvidos. Constatou-se também que as concentrações de amido nos embriões somáticos tenderam a aumentar significativamente em embriões no estágio globular para os estágios subsequentes em todas as culturas com três, quatro e cinco semanas de idade.

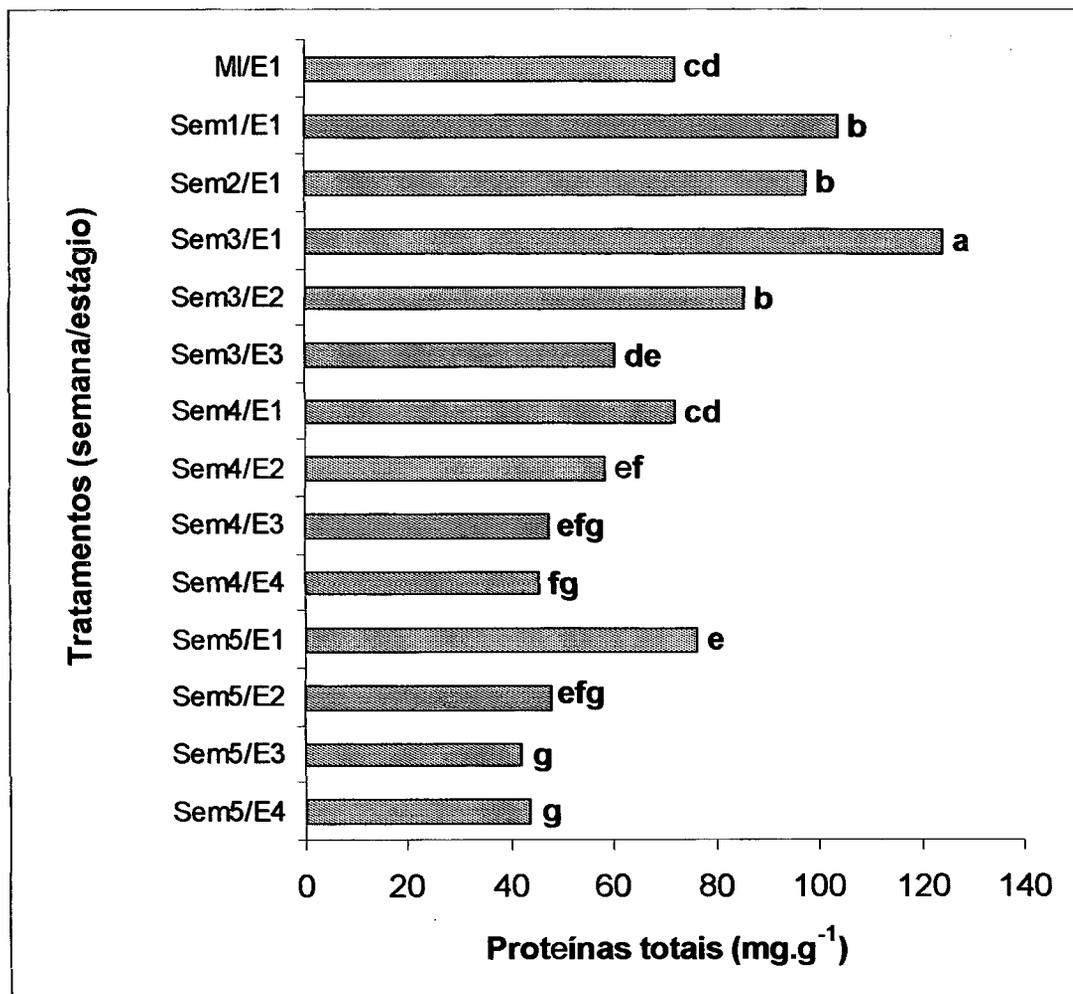


Figura 17. Níveis de proteínas totais (mg.g⁻¹ de matéria seca) em embriões somáticos de *O. catharinensis* em diferentes períodos de cultura *in vitro* e estágios de desenvolvimento. Sem = semana; MI = momento da inoculação; E1 = Estágio globular; E2 = Estágio cotiledonar inicial; E3 = Estágio cotiledonar intermediário; E4 = estágio maduro. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

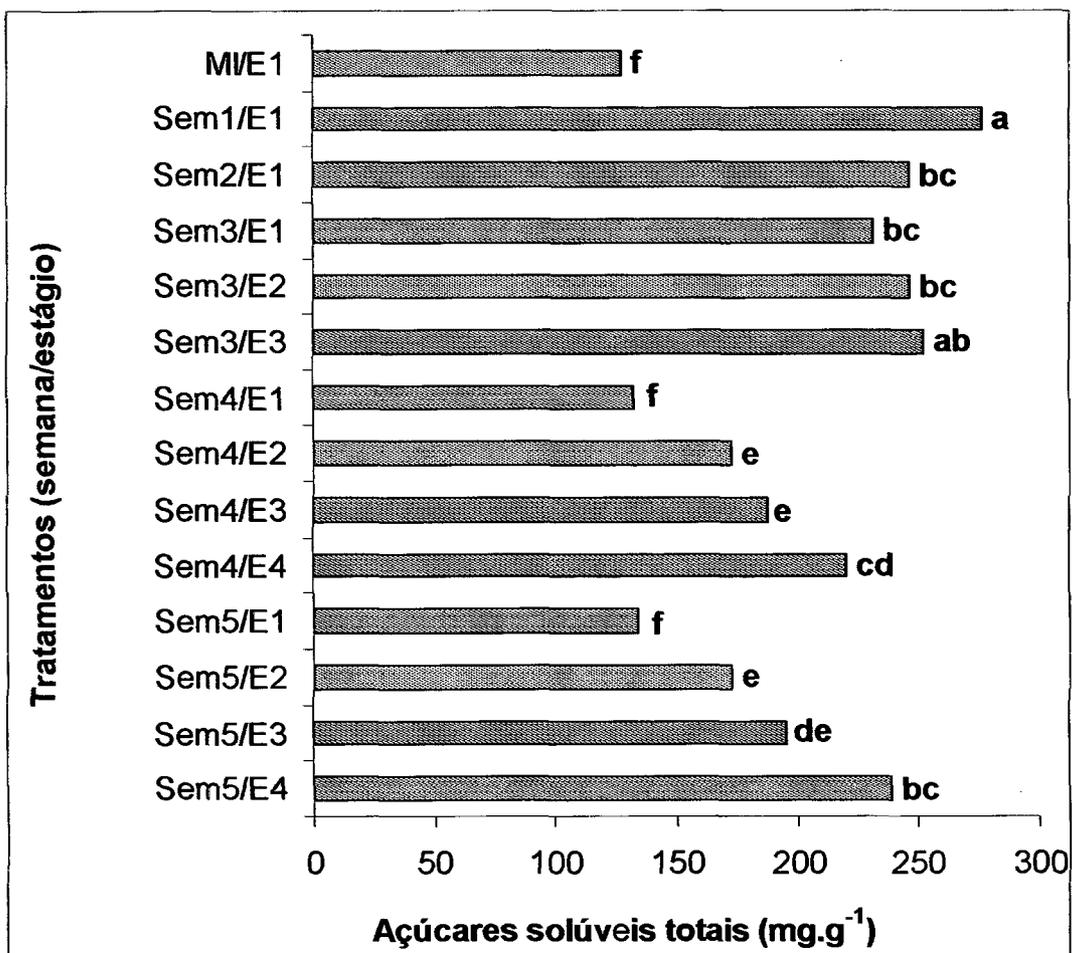


Figura 18. Níveis de açúcares solúveis totais (mg.g^{-1} de matéria seca) em embriões somáticos de *O. catharinensis* em diferentes períodos de cultura *in vitro* e estágios de desenvolvimento. Sem = semana; MI = momento da inoculação; E1 = Estágio globular; E2 = Estágio cotiledonar inicial; E3 = Estágio cotiledonar intermediário; E4 = estágio maduro. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

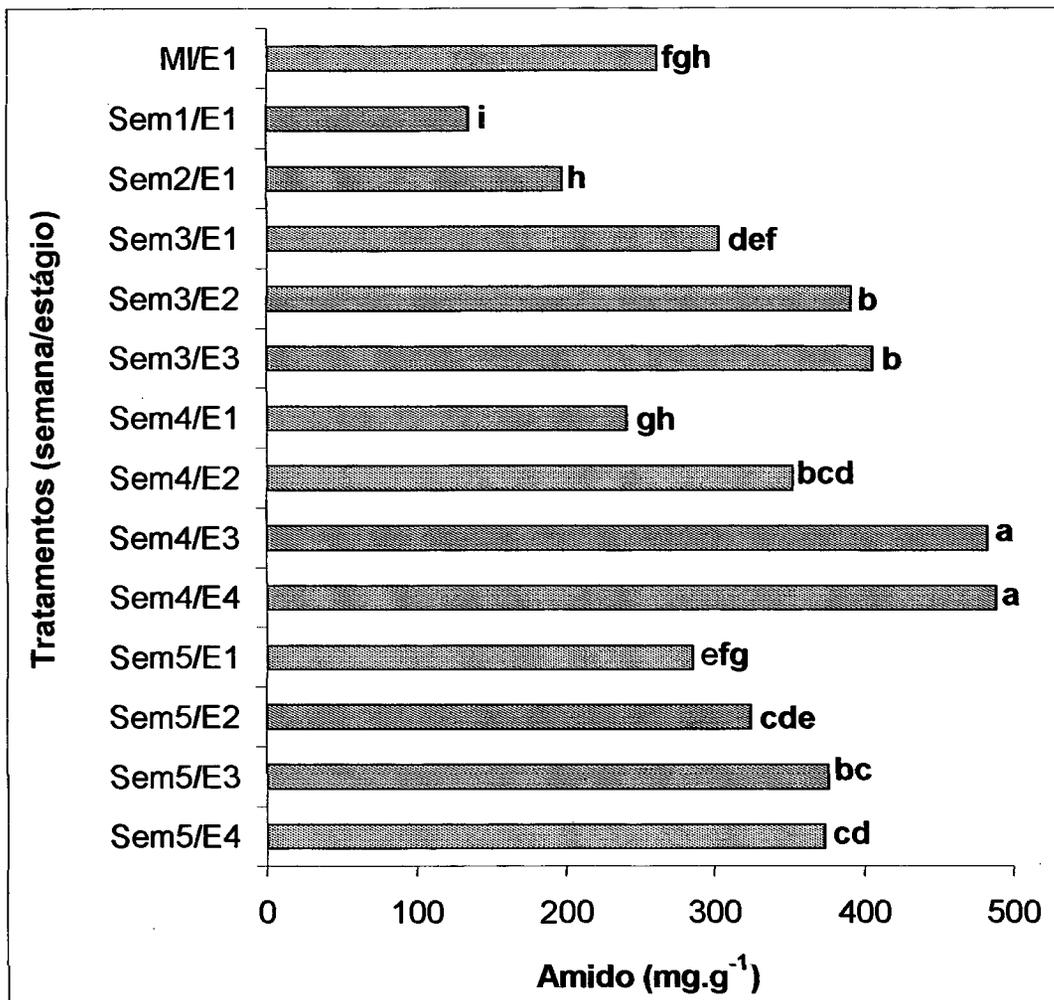


Figura 19. Níveis de amido (mg.g^{-1} de matéria seca) em embriões somáticos de *O. catharinensis* em diferentes períodos de cultura *in vitro* e estágios de desenvolvimento. Sem = semana; MI = momento da inoculação; E1 = Estágio globular; E2 = Estágio cotiledonar inicial; E3 = Estágio cotiledonar intermediário; E4 = estágio maduro. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.5.3. Efeito do sorbitol e do carvão ativado nos níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em culturas embriogênicas

A partir dos dados apresentados na Tabela 11 (item 4.3.2) foi possível o cálculo das concentrações de proteínas totais, açúcares solúveis e amido por g de matéria seca.

A Figura 20 mostra que níveis significativamente superiores de proteínas totais foram observados em culturas embriogênicas crescidas em meio de cultura suplementado com 2,75 g.L⁻¹ de sorbitol e na ausência de carvão ativado (85,2 mg.g⁻¹ de matéria seca), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Resultados inferiores de concentrações de proteínas totais foram observados em culturas embriogênicas desenvolvidas em meio de cultura suplementado com 22 g.L⁻¹ de sorbitol, não diferindo estatisticamente de culturas embriogênicas desenvolvidas em meio de cultura suplementado com carvão ativado e com 11 e 22 g.L⁻¹ de sorbitol.

Os resultados da Figura 21 indicam que valores máximos para açúcares solúveis totais foram observados em culturas embriogênicas oriundas do meio de cultura suplementado com carvão ativado e na presença de sorbitol (2,75 a 22 g.L⁻¹), não diferindo estatisticamente entre si. Valores significativamente inferiores de açúcares solúveis totais foram observados em culturas embriogênicas oriundas do meio de cultura sem carvão ativado, independente das concentrações de sorbitol, não diferindo estatisticamente entre si. Desta forma, os meios de cultura suplementados com sorbitol e carvão ativado possibilitaram que as culturas embriogênicas acumulassem os maiores níveis de açúcares solúveis totais.

As culturas embriogênicas produzidas em meios de cultura suplementados com 2,75 e 5,5 g.L⁻¹ de sorbitol sem carvão ativado, apresentaram níveis significativamente superiores de amido, não diferindo estatisticamente entre si (Figura 22). Houve uma redução significativa nos níveis de amido em culturas embriogênicas produzidas em meios de cultura: sem carvão ativado e sem sorbitol; somente com carvão ativado; com 22 g.L⁻¹ de sorbitol sem carvão ativado e com carvão ativado e 2,75 a 22 g.L⁻¹ de sorbitol; os quais não diferiram estatisticamente entre si. Desta forma, constatou-se uma tendência em haver reduções nos níveis de amido em culturas embriogênicas provenientes dos meios de cultura suplementados com carvão ativado, independente da concentração de sorbitol utilizada.

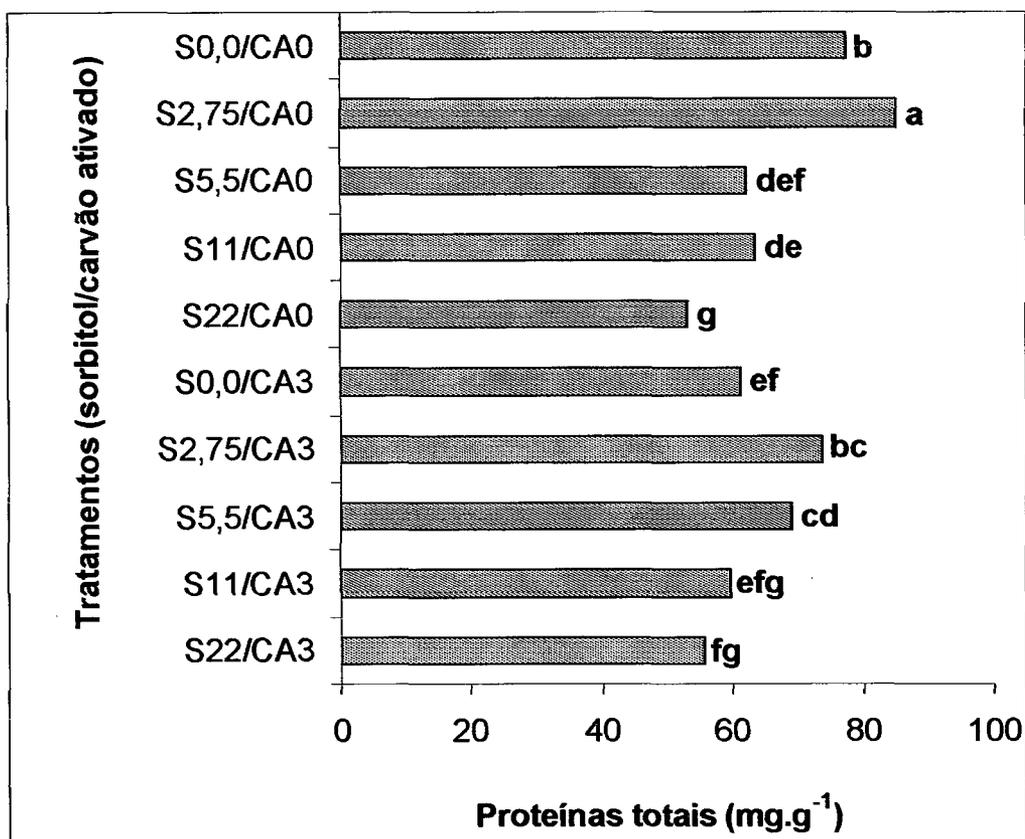


Figura 20. Níveis de proteínas totais (mg.g^{-1} de matéria seca) em culturas embriogênicas de *O. catharinensis* produzidas em meios de cultura contendo diferentes combinações de concentrações de sorbitol (0; 2,75; 5,5; 11 e 22 g.L^{-1}) e de carvão ativado (0 e 3 g.L^{-1}). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

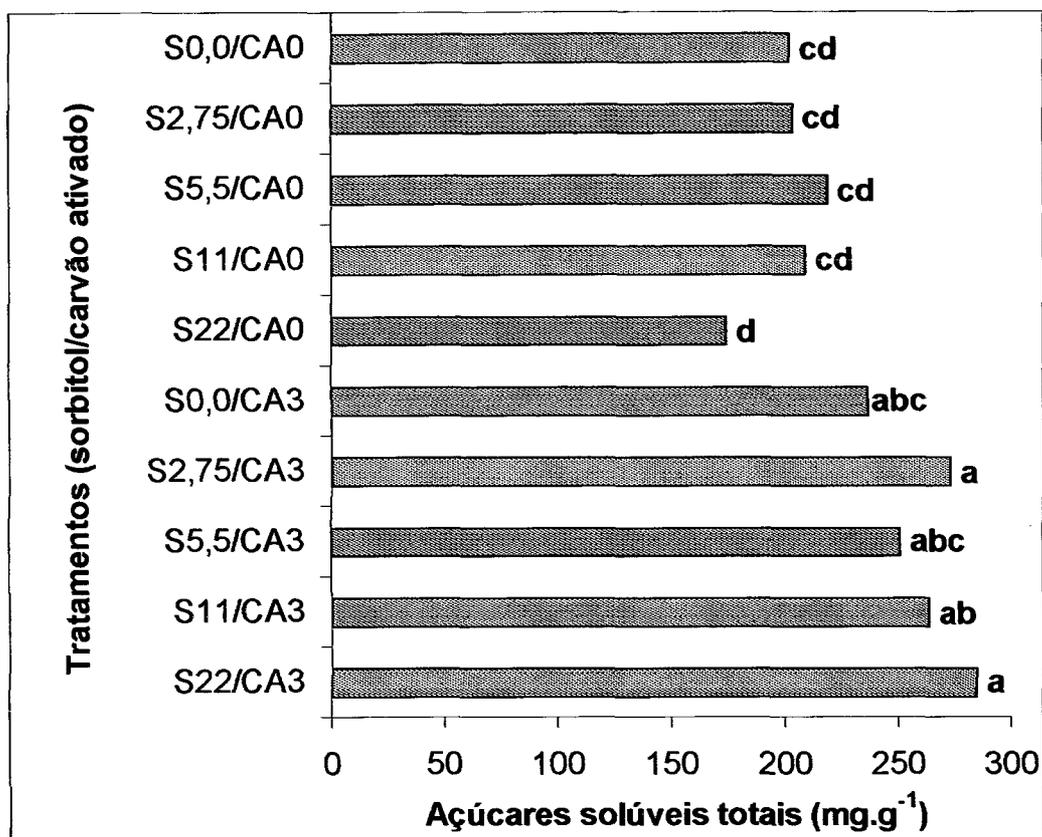


Figura 21. Níveis de açúcares solúveis totais (mg.g^{-1} de matéria seca) em culturas embriogênicas de *O. catharinensis* produzidas em meios de cultura contendo diferentes combinações de concentrações de sorbitol (0; 2,75; 5,5; 11 e 22 g.L^{-1}) e de carvão ativado (0 e 3 g.L^{-1}). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

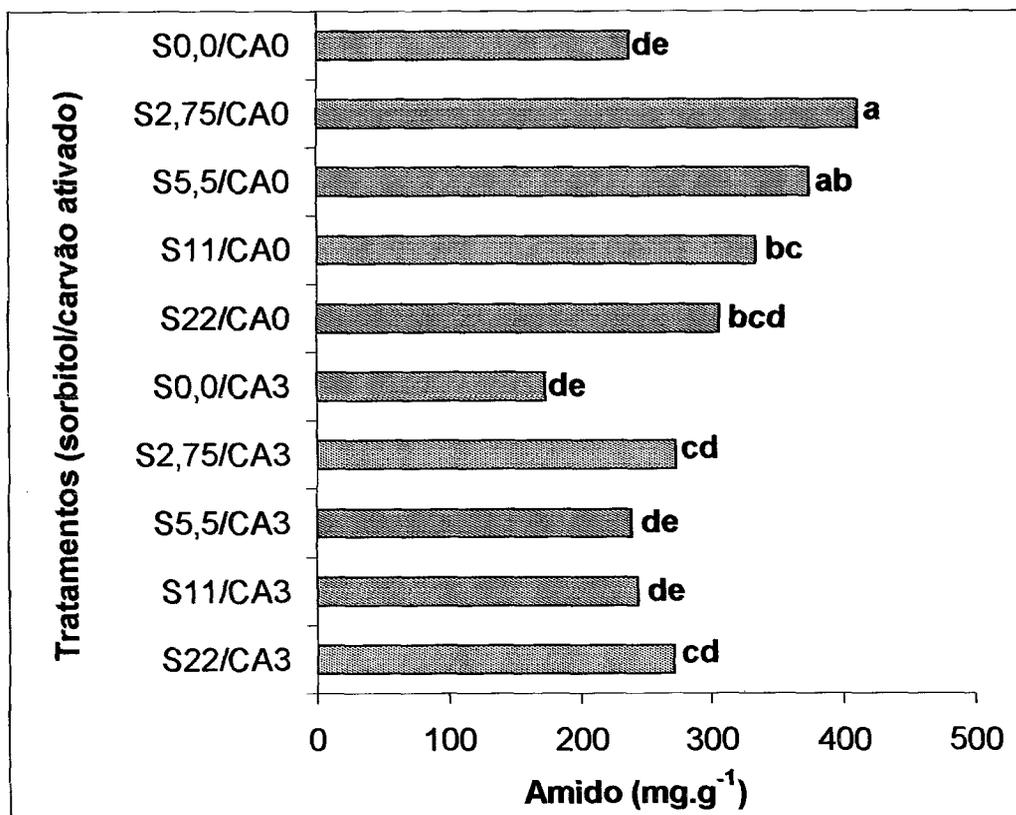


Figura 22. Níveis de amido (mg.g^{-1} de matéria seca) em culturas embriogênicas de *O. catharinensis* produzidas em meios de cultura contendo diferentes combinações de concentrações de sorbitol (0; 2,75; 5,5; 11 e 22 g.L^{-1}) e de carvão ativado (0 e 3 g.L^{-1}). Dados após 4 semanas de cultura *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.5.4. Níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em embriões somáticos desidratados

Os níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em embriões somáticos maduros, durante o período de desidratação lenta de 0-4 dias, são mostrados na Figura 23A, B e C. A Figura 23A mostra que níveis superiores de proteínas totais foram observados em embriões somáticos no segundo dia de desidratação, não diferindo estatisticamente de embriões somáticos no terceiro dia de desidratação. Embriões não desidratados e no primeiro dia de desidratação apresentaram níveis inferiores de proteínas totais, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Os níveis de açúcares solúveis totais foram superiores em embriões somáticos sem desidratar e diminuíram significativamente durante o período de desidratação (Figura 23B). A Figura 23C indica que os embriões somáticos não desidratados apresentaram os maiores níveis de amido, entretanto, não diferiram estatisticamente dos embriões somáticos após um, três e quatro dias de desidratação. Os níveis de amido destes embriões somáticos, por sua vez, não diferiram significativamente dos níveis de amido observados em embriões somáticos após dois dias de desidratação.

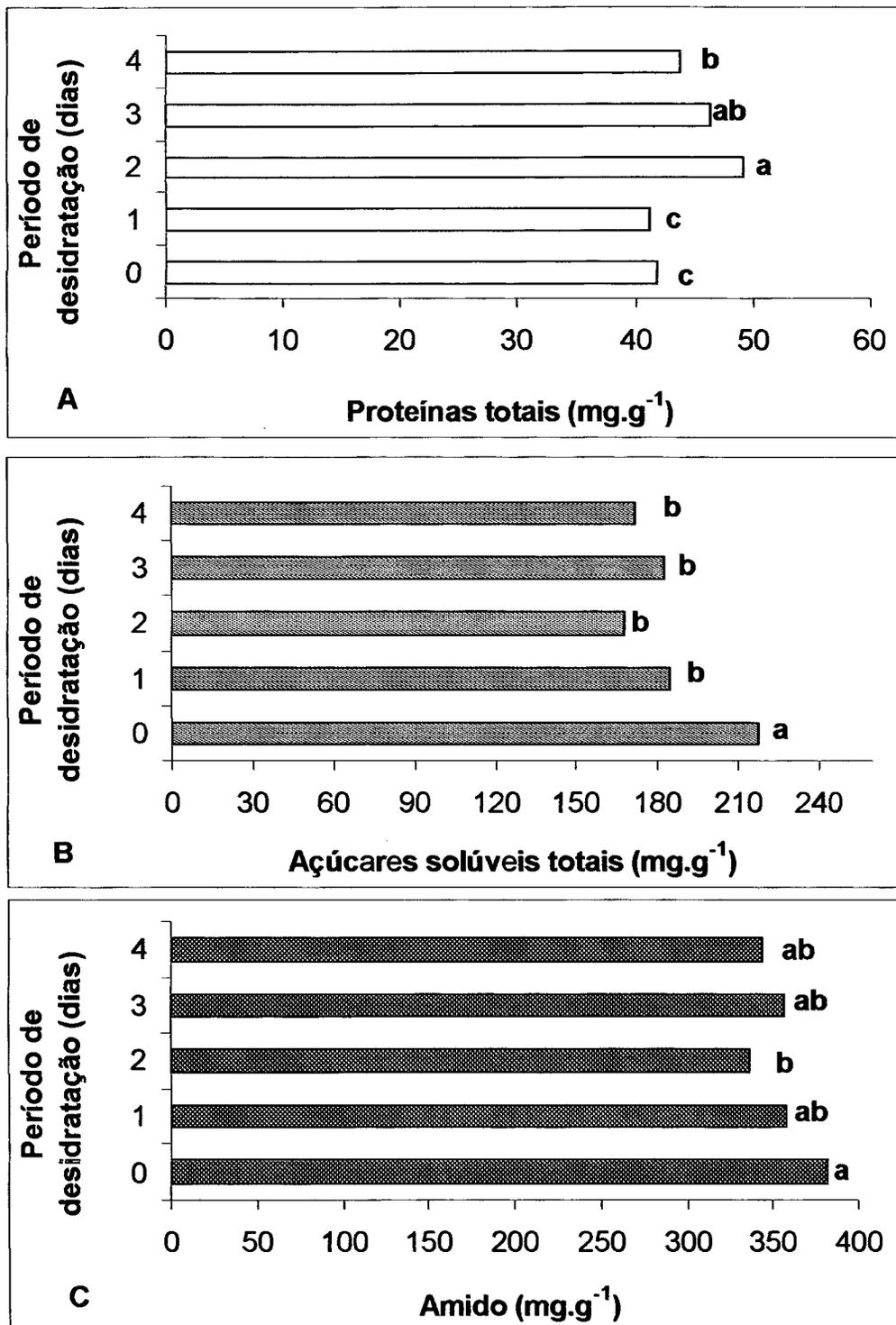


Figura 23. Níveis de proteínas totais (A), açúcares solúveis totais (B) e amido (C) (mg.g⁻¹ de matéria seca) em embriões somáticos maduros de *O. catharinensis* durante diferentes períodos de desidratação. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

4.6. Caracterização morfológica e histoquímica

4.6.1. Caracterização morfológica de embriões somáticos nos estágios de desenvolvimento

Os embriões somáticos foram caracterizados em quatro estágios de desenvolvimento: globular, cotiledonar inicial, cotiledonar intermediário e maduro. Estes embriões são formados por duas regiões distintas, a região cotiledonar e a região meristemática as quais mostraram morfologias variáveis ao longo do desenvolvimento.

A região do meristema apical da raiz nos embriões somáticos no estágio globular (Figura 24A) apresenta células pequenas, com grande núcleo, um ou mais nucléolos, citoplasma denso, aparentemente sem vacúolo (Figura 24B), enquanto que as células da região cotiledonar são maiores, apresentando citoplasma e núcleo parietais devido à presença de grande vacúolo (Figura 24C). Neste estágio, observou-se uma camada de células envolvendo o embrião, a protoderme, constituída por pequenas células com grandes núcleos e citoplasma denso (Figura 24C). Algumas células alongadas foram observadas na região cotiledonar indicando o início da diferenciação do procâmbio (Figura 24D).

A partir do estágio cotiledonar inicial foi observada a diferenciação dos dois cotilédones e o meristema apical da raiz (Figura 25A). Além disso, foi observada também a região correspondente ao meristema apical do ramo. As células do meristema apical da raiz apresentaram características morfológicas semelhantes às do embrião somático no estágio globular (Figura 25B). Os cotilédones apresentaram células maiores, com núcleo parietal, devido à presença do grande vacúolo. A protoderme possui células menores, quando comparadas às observadas no cotilédone (Figura 25C). Neste estágio, observou-se uma maior diferenciação do procâmbio (Figura 25D), o qual apresentou um maior número de células.

Os embriões somáticos no estágio cotiledonar intermediário (Figura 26A) apresentaram cotilédones mais desenvolvidos, formados por células cotiledonares maiores do que as observadas anteriormente (Figura 26B). Neste estágio, foram observadas células do meristema apical da raiz, com características semelhantes as anteriores. Além disso, foram observadas células com características meristemáticas

na região do meristema apical do ramo (Figura 26C). As células do procâmbio são mais alongadas, com núcleos alongados acompanhando a morfologia da célula (Figura 26D).

A Figura 27A mostra o embrião somático no estágio maduro, onde foi possível observar os dois cotilédones e o meristema apical da raiz (Figura 27B). Neste estágio, as células cotiledonares foram maiores em relação às células dos estágios anteriores (Figura 27C). A protoderme é formada por uma camada de células morfológicamente mais definidas, envolvendo o embrião somático (Figura 27D).

As observações morfológicas indicam que o desenvolvimento de embriões secundários se dá a partir de células da região do meristema apical da raiz, nos diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 28A-B).

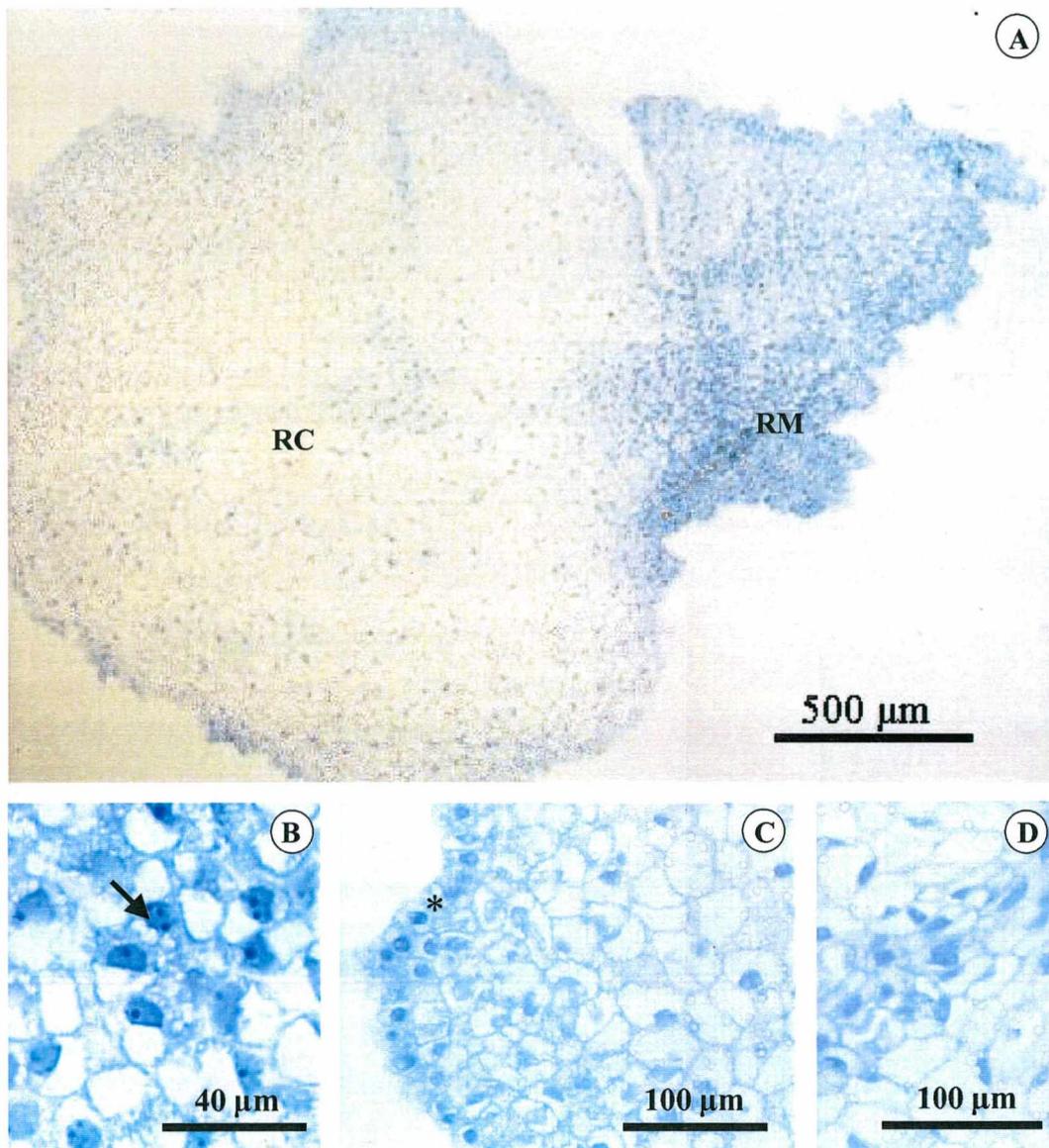


Figura 24. Embrião somático de *O. catharinensis* no estágio globular, corado com AA. **A.** Aspecto geral do embrião em corte longitudinal, mostrando a região meristemática (RM) e a região cotiledonar (RC). **B.** Células da região meristemática apical da raiz, com grandes núcleos e nucléolos evidentes (seta). **C.** Células da região cotiledonar, destacando a protoderme (*). **D.** Células do procâmbio em início de diferenciação.

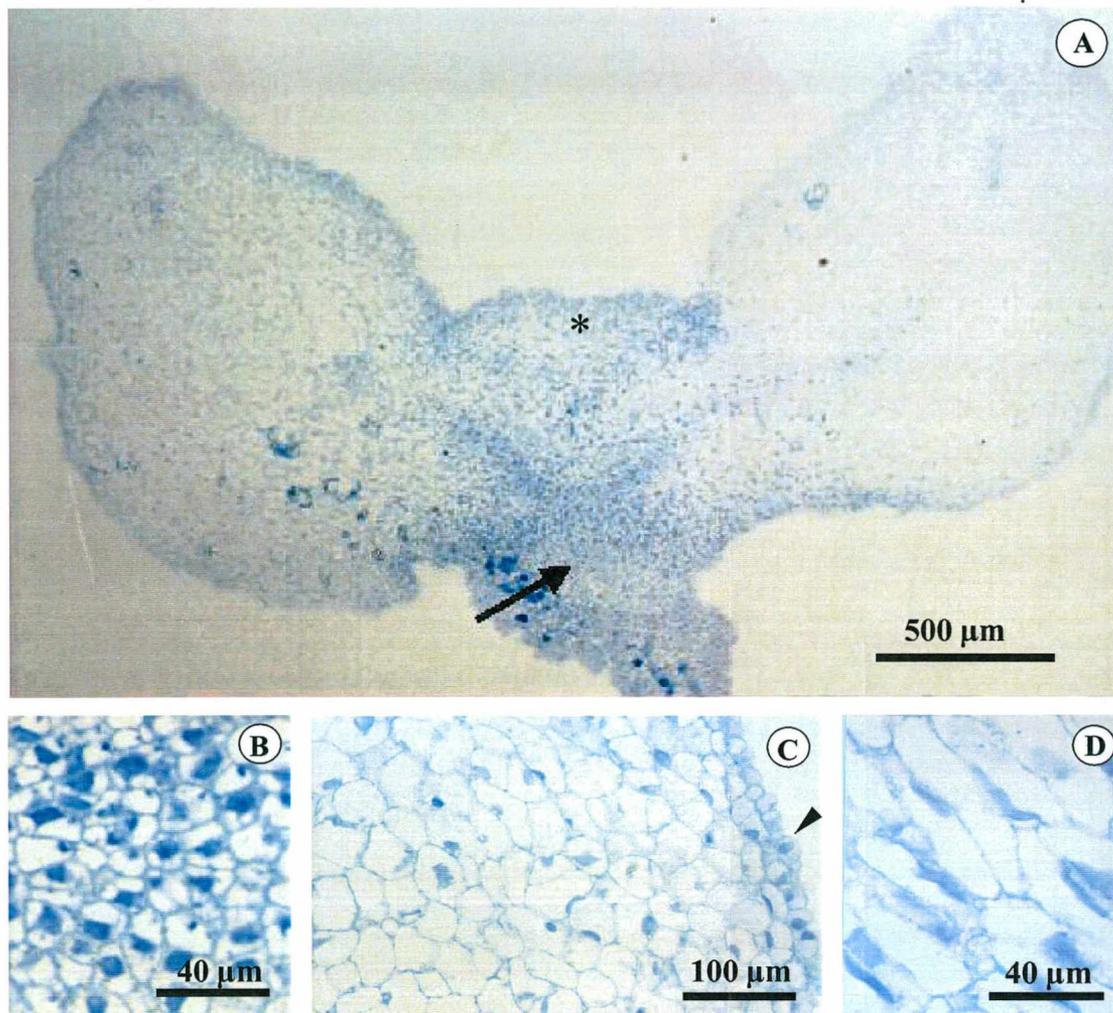


Figura 25. Embrião somático de *O. catharinensis* no estágio cotiledonar inicial, corado com AA. **A.** Aspecto geral do embrião em corte longitudinal, mostrando o meristema apical da raiz (seta) e a região cotiledonar. Neste corte pode ser observado a região do meristema apical do ramo (*). **B.** Células do meristema apical da raiz com núcleos centrais envolvidos por vacúolos de tamanhos variáveis. **C.** Células do cotilédone, mostrando a protoderme, com núcleos que ocupam a maior parte do volume citoplasmático (cabeça de seta). **D.** Região do procâmbio destacando células alongadas com núcleos acompanhando a morfologia celular.

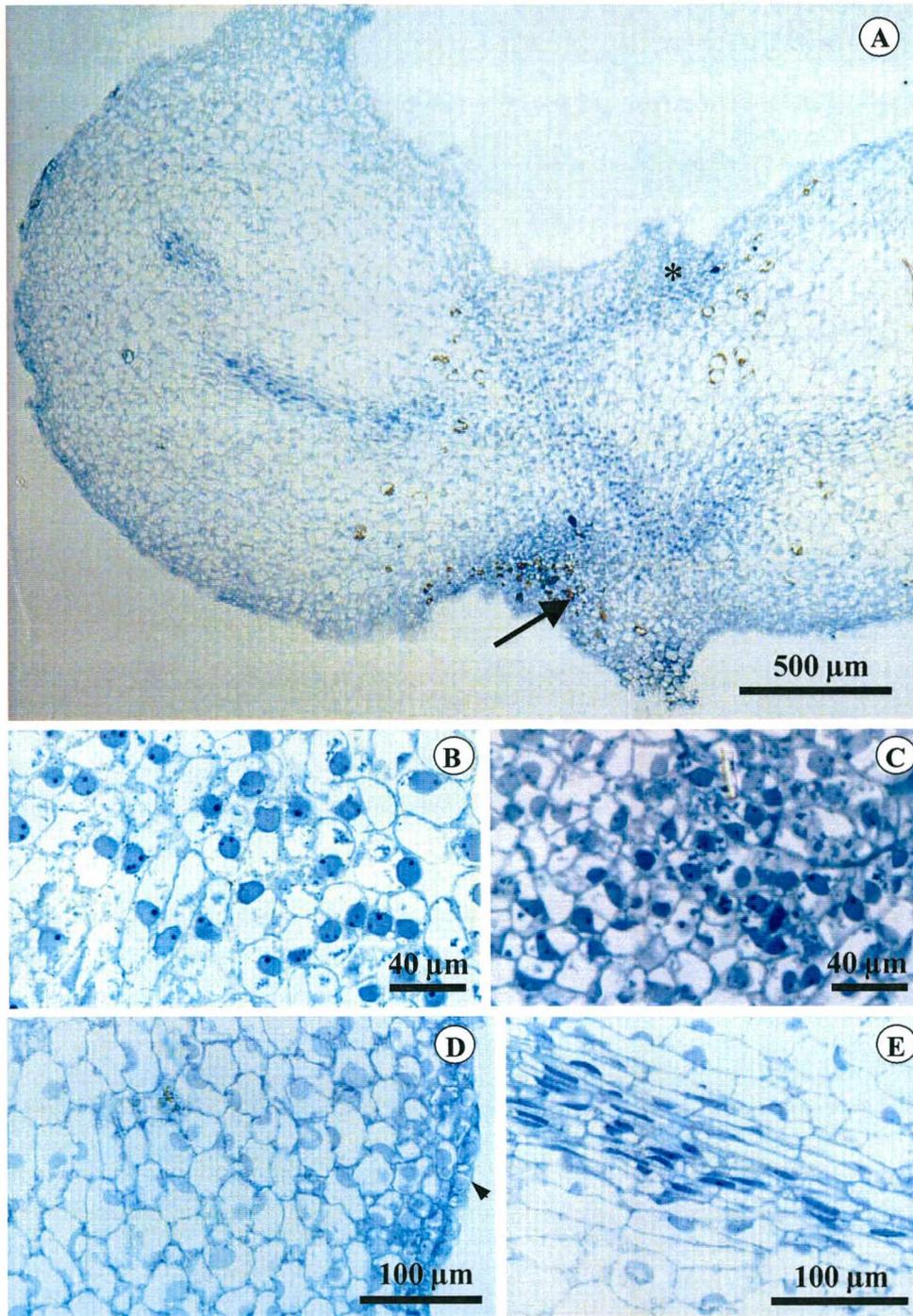


Figura 26. Embrião somático de *O. catharinensis* no estágio cotiledonar intermediário, corado com AA. **A.** Aspecto geral do embrião em corte longitudinal, mostrando a região cotiledonar, região meristemática apical da raiz (seta) e apical do ramo (*). **B.** Células do meristema apical da raiz, com núcleos grandes e nucléolos evidentes. **C.** Células do meristema apical do ramo, com morfologia semelhante às células observadas no meristema apical da raiz. **D.** Células do cotilédone com núcleos parietais e células da protoderme isodiamétricas (cabeça de seta). **E.** Células do procâmbio, com núcleos parietais alongados.

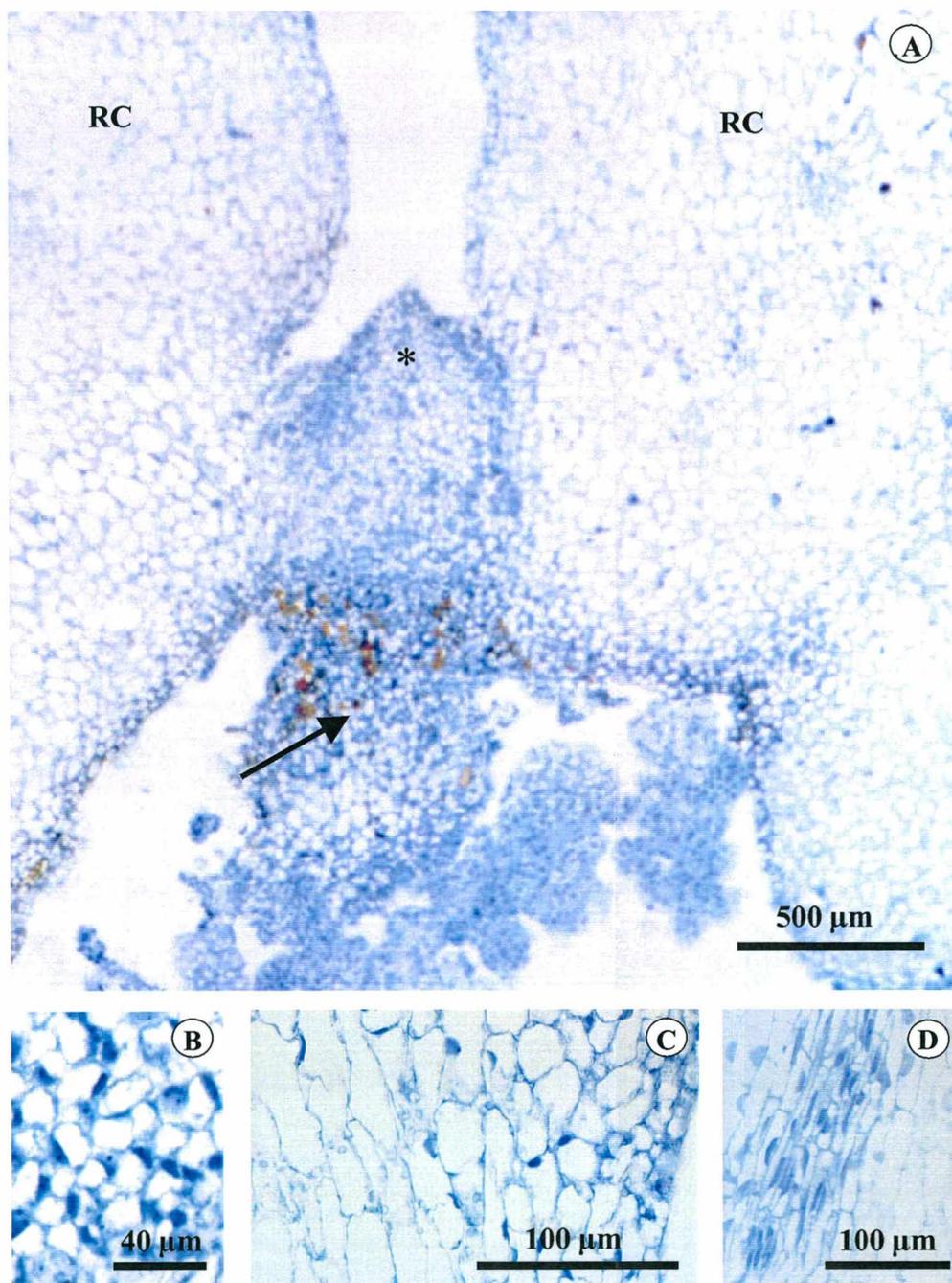


Figura 27. Embrião somático de *O. catharinensis* no estágio maduro, corado com AA. **A.** Aspecto geral do embrião em corte longitudinal, mostrando a região do meristema apical da raiz (seta), apical do ramo (*) e a região cotiledonar (RC). **B.** Células do meristema apical da raiz com morfologia semelhante aos estágios anteriores. **C.** Células do cotilédone e da protoderme, com morfologia semelhante as observadas nos estágios anteriores. **D.** Células do procâmbio, mostrando núcleos parietais alongados, acompanhando a morfologia celular.

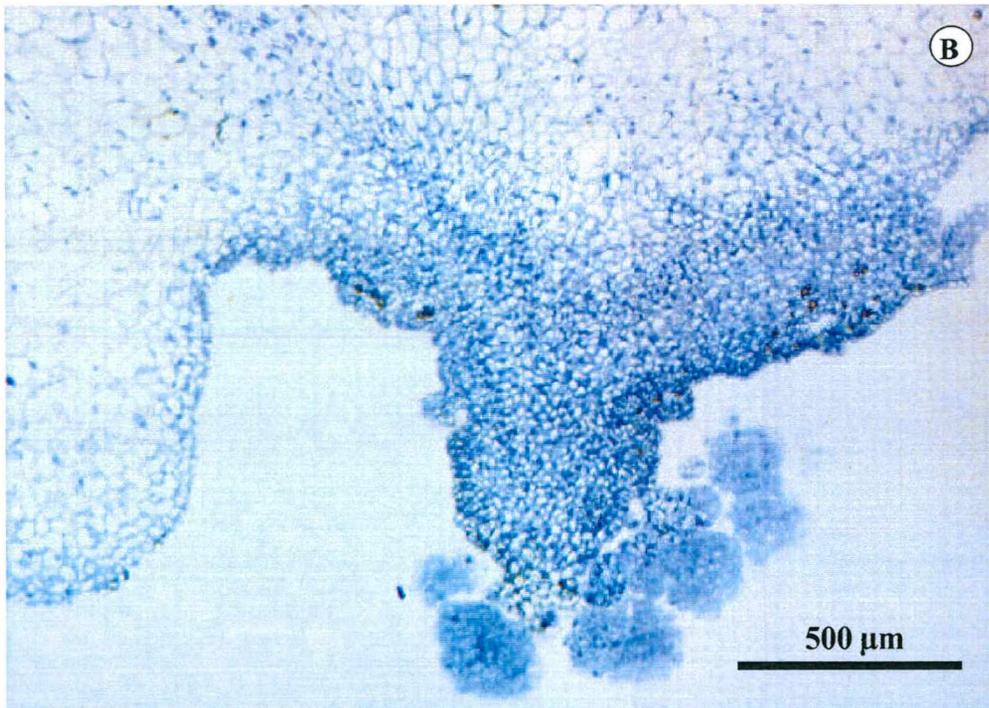
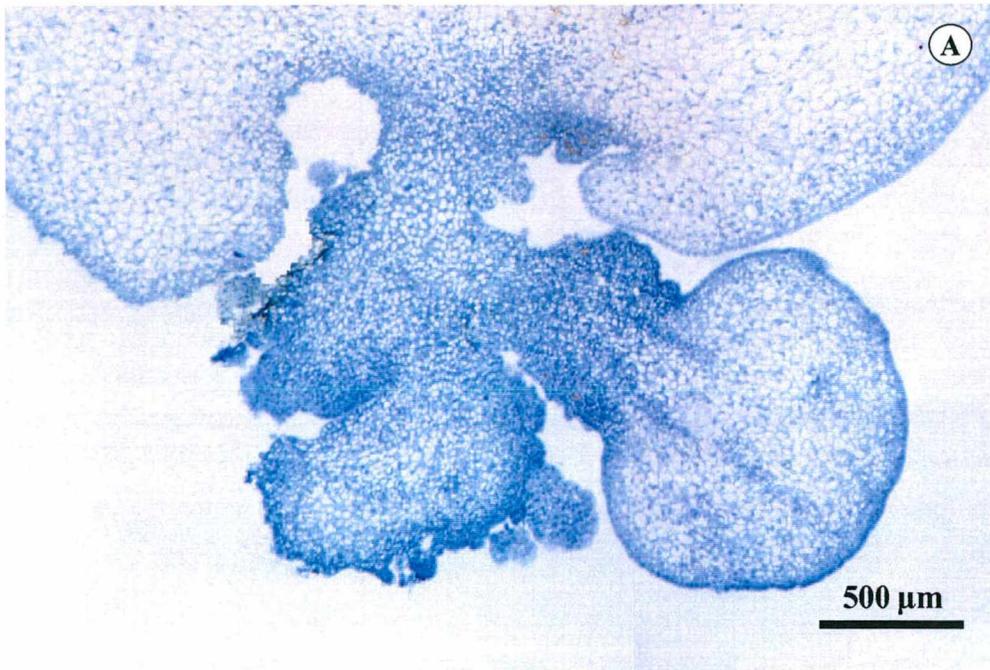


Figura 28. Embriogênese secundária em embriões somáticos de *O. catharinensis*, corados com AA. **A.** Embrião somático no estágio cotiledonar inicial, mostrando o desenvolvimento de embriões secundários no estágio globular, a partir de células localizadas na região do meristema apical da raiz. **B.** Embrião somático no estágio maduro, mostrando o desenvolvimento de embriões secundários, a partir de células do meristema apical da raiz.

4.6.2. Caracterização histoquímica de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento

A Tabela 14 apresenta uma síntese dos resultados obtidos com os testes histoquímicos em embriões somáticos produzidos em meio de cultura padrão, mostrando as diferentes regiões, tipos de células e locais destas células onde ocorreram as reações.

As células do meristema apical da raiz de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento apresentaram características semelhantes em relação aos testes histoquímicos. Estas células reagiram positivamente ao CBB, evidenciando grande concentração de proteínas citoplasmáticas (Figura 29A). Em algumas destas células, granulações protéicas de tamanhos variados foram observadas ocupando grande parte do volume celular ou distribuídas como pequenos grânulos (Figura 29B). A reação de PAS mostrou que estas células são ricas em pequenos grãos de amido (Figura 29C) e a parede celular destas células é formada por uma mistura de polissacarídeos neutros e ácidos que reagiram positivamente a reação de PAS (Figura 29C) e metacromaticamente ao AT-O (Figura 29D). Entretanto, a parede celular destas células reagiu fracamente ao AB em pH 0,5. Estas células quando tratadas com Sudan negro (SB-B) mostraram pequenos grânulos de lipídios distribuídos por todo o citoplasma (Figura 29E). As células do meristema apical do ramo reagiram positivamente ao CBB (Figura 30A) e metacromaticamente ao AT-O (Figura 30B), apresentando características semelhantes às células do meristema apical da raiz. Entretanto, estas células não apresentaram grãos de amido quando submetidas à reação de PAS (Figura 30C), diferindo das células do meristema apical da raiz.

As células da região cotiledonar reagiram positivamente ao CBB somente na região nuclear e numa fina camada de citoplasma periférico (Figura 31A). Os grãos de amido são maiores do que os observados nas células do meristema apical da raiz, ocorrendo em menor quantidade nas células centrais, enquanto que, nas células periféricas do cotilédone, estes são mais abundantes (Figura 31B). Nas células da protoderme os grãos de amido são menores, semelhantes aos observados nas células do meristema apical da raiz (Figura 31B). Uma característica interessante observada foi a presença de grãos de amido, de forma agregada, tanto

nas células cotiledonares quanto nas protodérmicas (Figura 31C). A parede celular das células cotiledonares apresentou as mesmas características em relação às colorações das células do meristema apical da raiz (Figuras 31D). As células cotiledonares reagiram fracamente quando coradas com SB-B, evidenciando pequena concentração de lipídios nesta região (Figura 31E). Entretanto, algumas células da protoderme apresentaram reação positiva para lipídios quando coradas com SB-B (Figura 31F).

As células do procâmbio reagiram positivamente ao CBB, evidenciando uma uniformidade citoplasmática no conteúdo protéico (Figura 32A). A parede celular apresentou característica semelhante a das células meristemáticas e cotiledonares, as quais reagiram positivamente ao PAS (Figura 32B), metacromaticamente ao AT-O (Figura 32C) e fracamente ao AB. Porém, nestas células não foram observados grãos de amido (Figura 32B).

Os embriões secundários apresentam células do meristema apical da raiz que reagiram positivamente ao CBB (Figura 33A) evidenciando grande concentração de proteínas citoplasmáticas quando comparada com as células cotiledonares. Nestas células, os grãos de amido são menores e em maior quantidade (Figura 33B), e a parede celular é formada por uma mistura de polissacarídeos neutros e ácidos, a qual reagiu positivamente à reação de PAS, metacromaticamente ao AT-O (Figuras 33B e C) e fracamente ao AB.

4.6.3. Caracterização histoquímica de embriões somáticos crescidos em diferentes concentrações de sorbitol e de carvão ativado

A Tabela 15 mostra que os embriões somáticos não apresentaram variações em relação aos testes histoquímicos CBB, AT-O e AB, quando produzidos em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de sorbitol e de carvão ativado. Entretanto, para a reação de PAS, foi observada uma variação significativa na quantidade de grãos de amido nas células cotiledonares dos embriões somáticos, proporcional ao aumento da concentração de sorbitol (Tabela 16). Embriões somáticos provenientes do meio de cultura WPM sem sorbitol, com ou sem carvão ativado, apresentaram menor quantidade de grãos de amido nas células da região cotiledonar, quando comparado com as células cotiledonares de embriões somáticos

provenientes do meio de cultura contendo 22 g.L⁻¹ de sorbitol (Figuras 34A e B). As células da protoderme não apresentaram grãos de amido quando os embriões foram cultivados na ausência de sorbitol e na presença ou não de carvão ativado (Figuras 34A e B), diferindo dos resultados obtidos com os embriões cultivados no meio com 22 g.L⁻¹ de sorbitol.

4.6.4. Caracterização histoquímica de embriões somáticos desidratados

Os testes histoquímicos para proteínas totais e polissacarídeos ácidos não apresentaram variações significativas nos embriões somáticos durante diferentes períodos de desidratação. Entretanto, foram observadas variações no tamanho, localização e quantidade de grãos de amido. Em embriões somáticos desidratados, células centrais do cotilédone apresentaram número reduzido de grãos de amido (Figura 35A), aumentando gradativamente em relação à periferia em tamanho e quantidade (Figura 35B). As células da protoderme não apresentaram variações, apresentando grãos de amido de tamanho pequeno e em grande quantidade, semelhante às células de embriões somáticos não desidratados (Figura 35B).

Tabela 14. Testes histoquímicos em microscopia de luz nas células da Região Meristemática (RM), Células da Região Cotiledonar (RC), Células da Protoderme (Pr), Células do Procâmbio (Pc) no núcleo (Nu), no citoplasma (Ci) e na parede celular (PC), de embriões somáticos de *O. catharinensis*, em diferentes estágios de desenvolvimento.

Constituintes	Testes	Células da RM			Células da RC			Células da Pr			Células do Pc		
		Nu	Ci	PC	Nu	Ci	PC	Nu	Ci	PC	Nu	Ci	PC
Polissacarídeos neutros	PAS	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	-	+++
Polissacarídeos ácidos	AT-O	++	++	+++	++	+	+++	++	++	+++	++	+	+++
Polissacarídeos sulfatados	Azul de alcian	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Proteínas totais	CBB	+++	+++	-	++	+	-	+++	++	-	+++	+	-
Lipídio	Sudan negro	-	++	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-

Símbolos: - não reagiu; + fracamente positiva, ++ moderadamente positiva, +++ fortemente positiva

Tabela 15. Testes histoquímicos em microscopia de luz nas células da Região Meristemática (RM), da Região Cotiledonar (RC), da Protoderme (Pr) e do Procâmbio (Pc) no núcleo (Nu), no citoplasma (Ci) e na parede celular (PC) de embriões somáticos de *O. catharinensis* produzidos em meios de cultura contendo diferentes concentrações de sorbitol (0; 2,75; 5,5; 11 e 22 g.L⁻¹) e de carvão ativado (0 e 3 g.L⁻¹).

Constituintes	Testes	Células da RM			Células da RC			Células da Pr			Células do Pc		
		Nu	Ci	PC	Nu	Ci	PC	Nu	Ci	PC	Nu	Ci	PC
Polissacarídeos ácidos	AT-O	++	++	+++	++	+	+++	++	++	+++	++	+	+++
Polissacarídeos sulfatados	Azul de alcian	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Proteínas totais	CBB	+++	+++	-	++	+	-	+++	++	-	++	+	-

Símbolos: - não reagiu; + fracamente positiva, ++ moderadamente positiva, +++ fortemente positiva

Tabela 16. Teste da reação de PAS (ácido periódico de Schiff) em células da Região Meristemática (RM), da Região Cotiledonar (RC), da Protoderme (Pr) e do Procâmbio (Pc) no núcleo (Nu), no citoplasma (Ci) e na parede celular (PC) de embriões somáticos de *O. catharinensis* produzidos em meios de cultura contendo diferentes concentrações de sorbitol (0; 2,75; 5,5; 11 e 22 g.L⁻¹) e de carvão ativado (0 e 3 g.L⁻¹).

Concentração sorbitol (g.L ⁻¹)	Carvão ativado (g.L ⁻¹)	Células da RM			Células da RC			Células da Pr			Células do Pc		
		Nu	Ci	PC	Nu	Ci	PC	Nu	Ci	PC	Nu	Ci	PC
0,0	0	-	++	+++	-	+	+++	-	-	+++	-	-	+++
2,75	0	-	++	+++	-	+	+++	-	+	+++	-	-	+++
5,5	0	-	++	+++	-	+	+++	-	+	+++	-	-	+++
11	0	-	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	-	-	+++
22	0	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	-	+++
0,0	3	-	++	+++	-	+	+++	-	-	+++	-	-	+++
2,75	3	-	++	+++	-	+	+++	-	-	+++	-	-	+++
5,5	3	-	++	+++	-	+	+++	-	+	+++	-	-	+++
11	3	-	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	-	-	+++
22	3	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	-	+++

Símbolos: - não reagiu; + fracamente positiva, ++ moderadamente positiva, +++ fortemente positiva

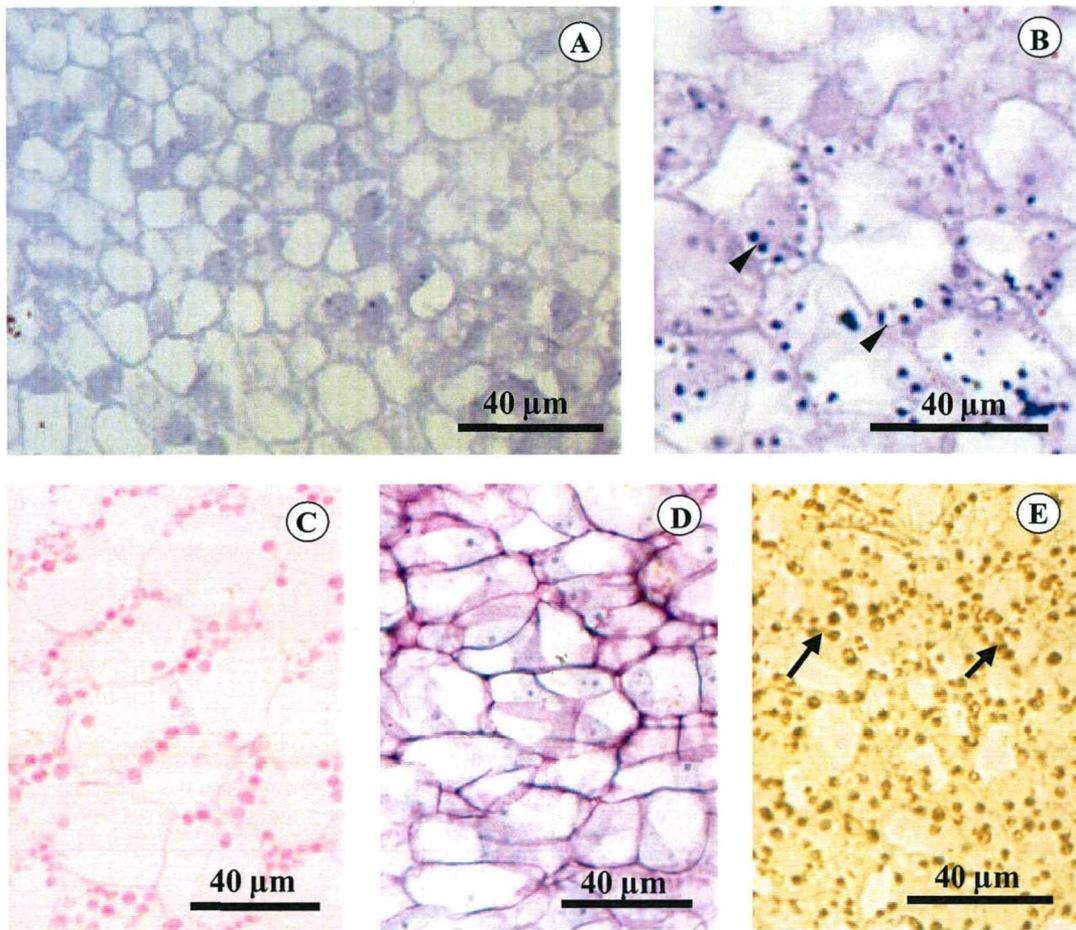


Figura 29. Células do meristema apical da raiz submetidas a diferentes testes histoquímicos. **A.** Células do meristema apical da raiz com citoplasma positivo ao CBB, mostrando acúmulo de organelas protéicas. **B.** Células do meristema com granulações CBB positivas (cabeças de setas). **C.** Células do meristema com pequenos grãos de amido e parede celular PAS positiva. **D.** Células do meristema coradas com AT-O, com reação metacromática principalmente na parede celular. **E.** Células do meristema coradas com SB-B, mostrando as granulações lipídicas (setas).

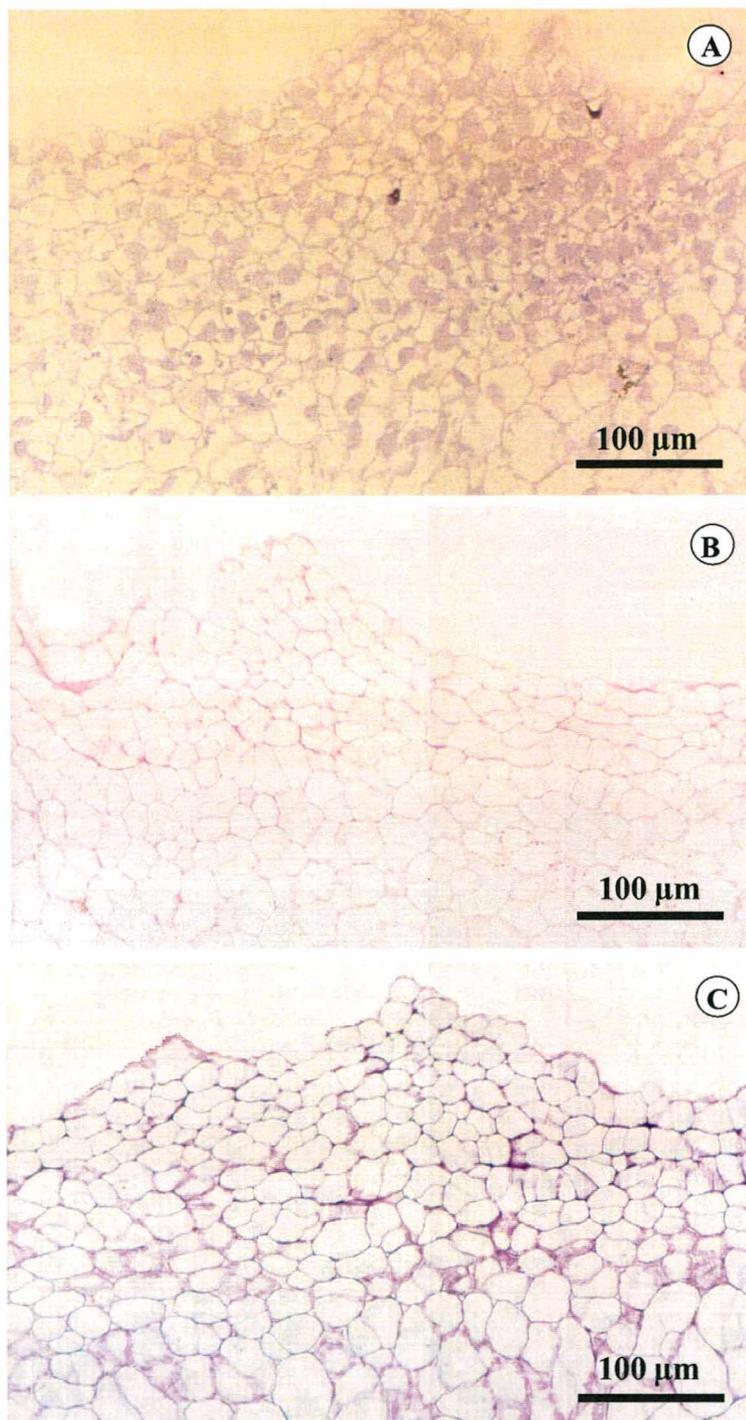


Figura 30. Células do meristema apical do ramo submetidas a diferentes testes histoquímicos. **A.** Células do meristema mostrando citoplasma CBB positivo. **B.** Células do meristema coradas com AT-O, mostrando reação metacromática principalmente na parede celular. **C.** Células do meristema mostrando parede celular PAS positiva e ausência de grãos de amido.

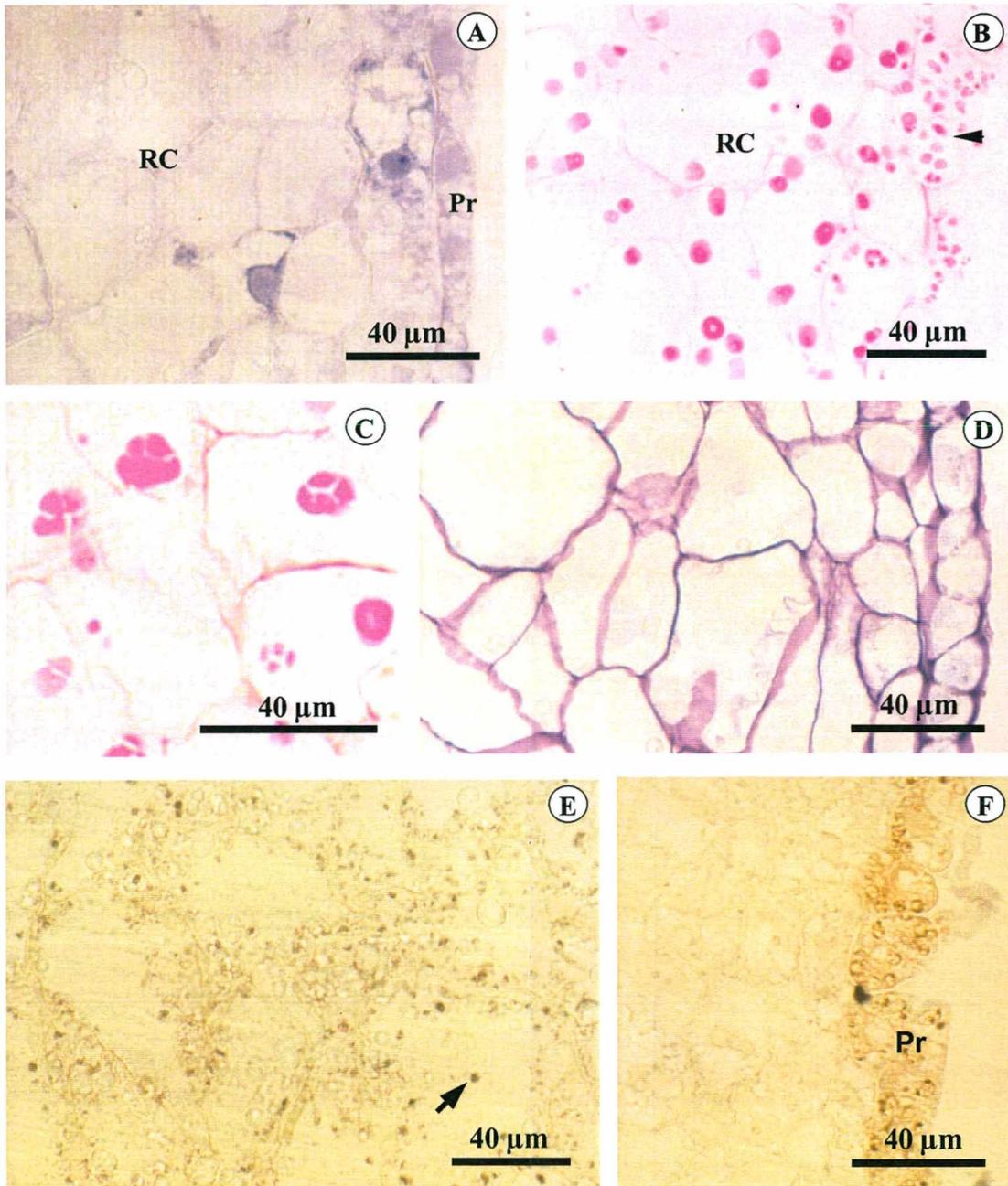


Figura 31. Células da região cotiledonar e da protoderme submetidas a diferentes testes histoquímicos. **A.** Células do cotilédone (RC) CBB positivas no citoplasma parietal devido a presença de um grande vacúolo, observa-se que as células da protoderme (Pr) apresentam citoplasma CBB positivo. **B.** Células da região cotiledonar (RC) com grandes grãos de amido e parede celular PAS positiva, mostrando grãos de amido menores nas células da protoderme (cabeça de seta). **C.** Células do cotilédone com grãos de amido distribuídos de forma agregada. **D.** Células do cotilédone e da protoderme com parede celular metacromáticas ao AT-O. **E.** Células da região cotiledonar apresentando leve reação positiva ao SB-B (seta). **F.** Células da protoderme evidenciando reação positiva ao SB-B.

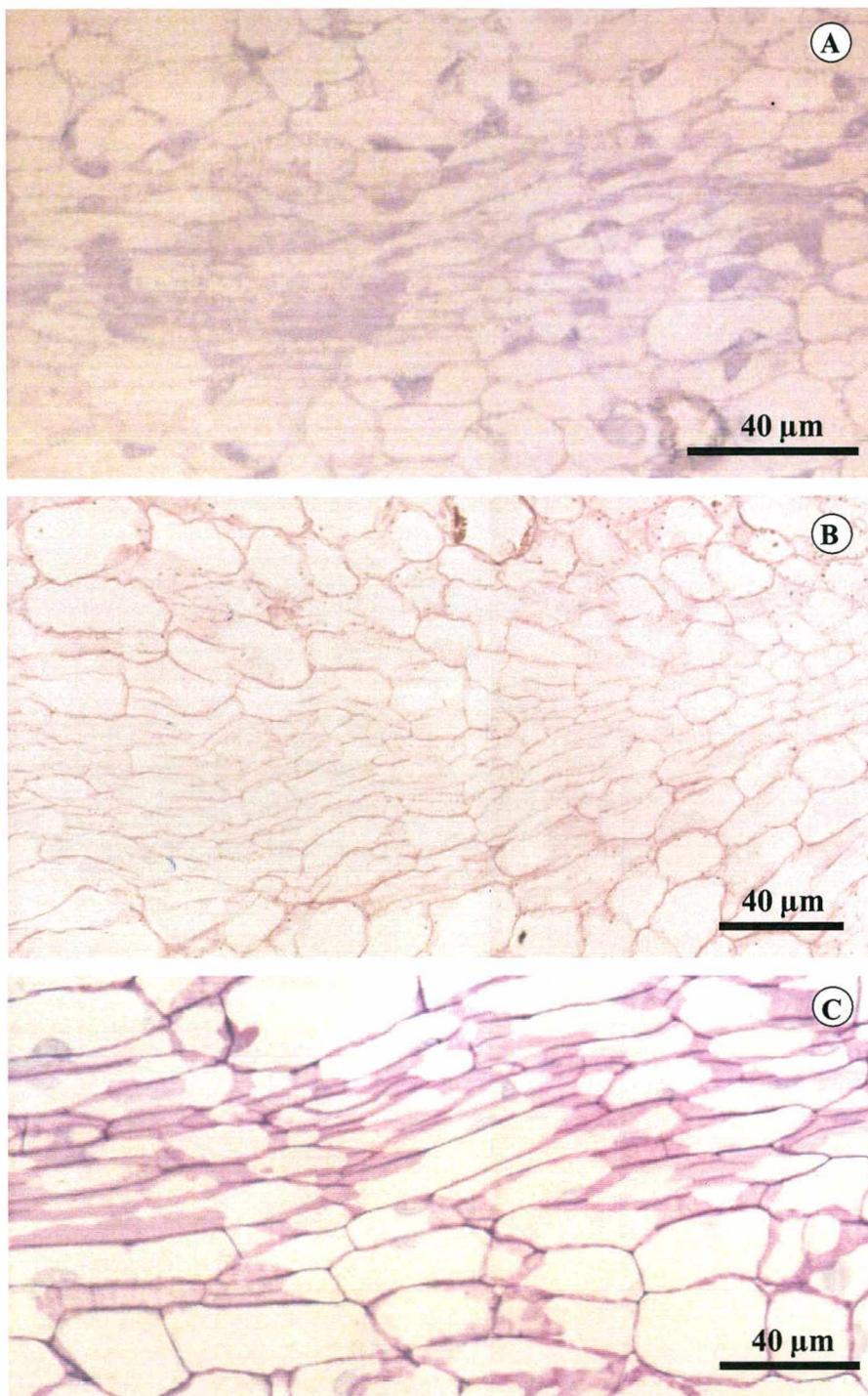


Figura 32. Células do procâmbio submetidas a diferentes testes histoquímicos. **A.** Células do procâmbio mostrando reação positiva ao CBB limitada ao núcleo e ao citoplasma parietal. **B.** Células do procâmbio mostrando a reação PAS positiva na parede celular. Observa-se que não houve acúmulo de amido no citoplasma destas células. **C.** Células do procâmbio com reação metacromática ao AT-O restrita a parede celular.

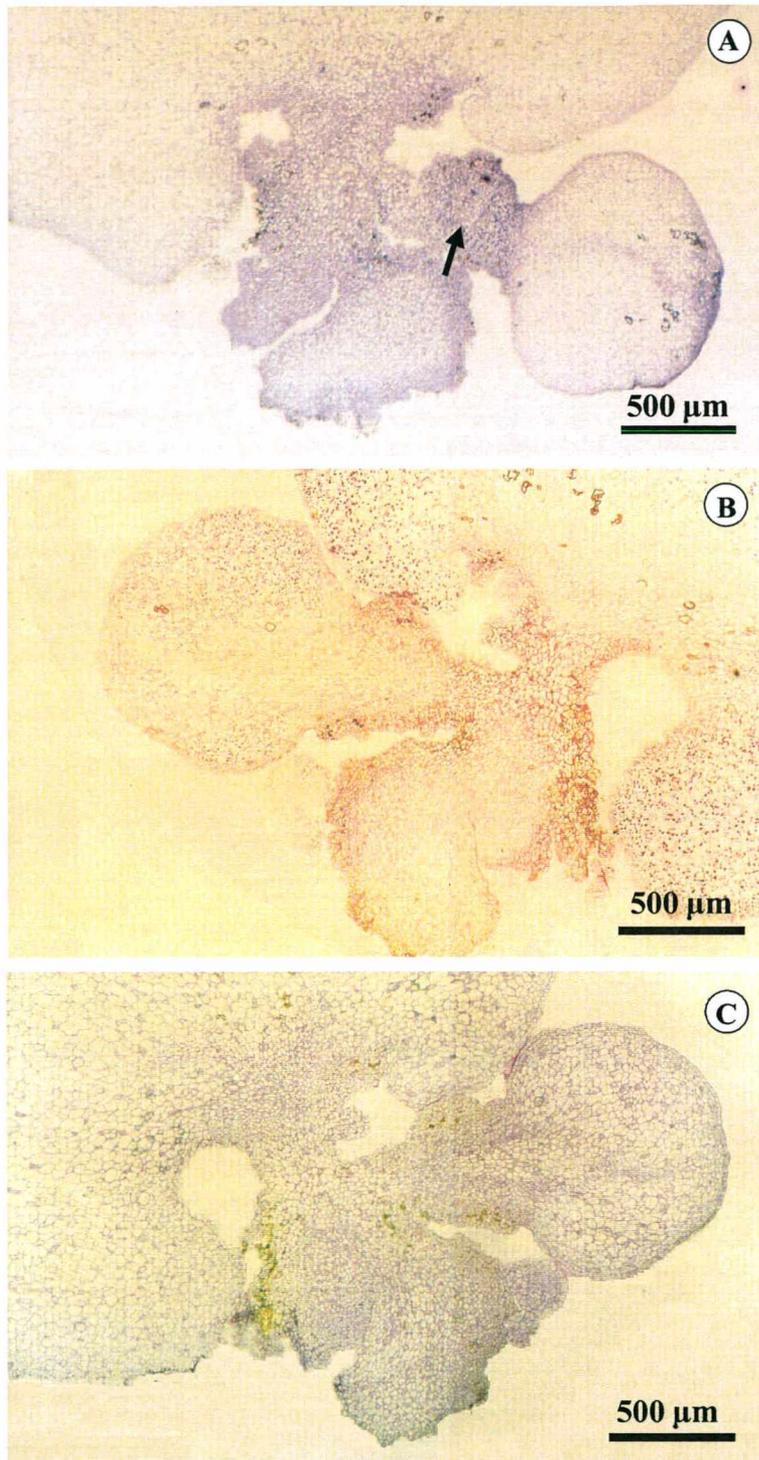


Figura 33. Embriogênese secundária em embriões somáticos de *O. catharinensis* submetida a diferentes testes histoquímicos. **A.** Células do embrião secundário com reação positiva ao CBB, especialmente na região do meristema apical da raiz (seta). **B.** Células do embrião secundário com reação PAS positiva, apresentando grãos de amido distribuídos nas células do meristema apical da raiz e cotiledonares. **C.** Células do embrião secundário com parede celular metacromática ao AT-O.

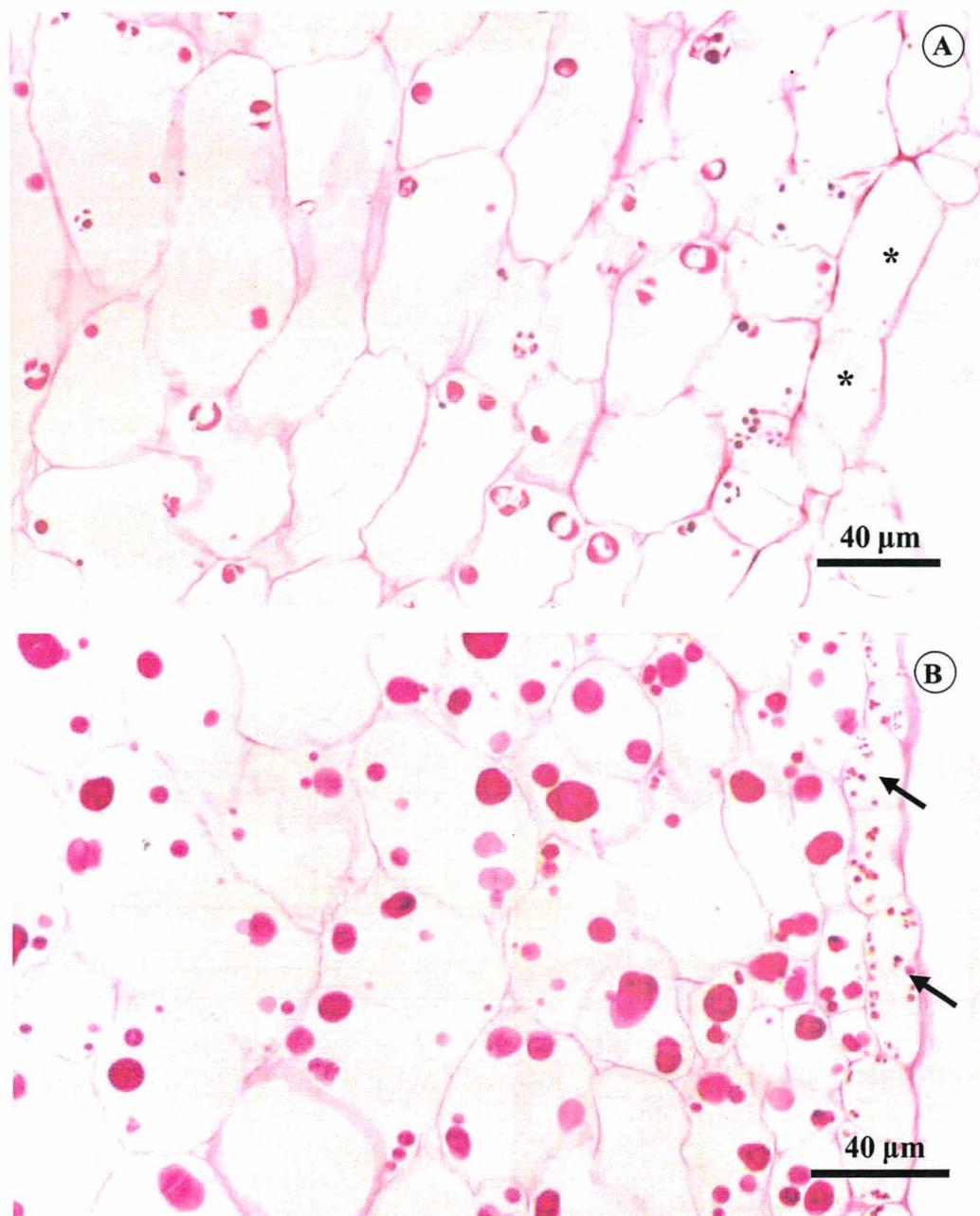


Figura 34. Embriões somáticos de *O. catharinensis* crescidos em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de sorbitol e de carvão ativado submetidos à reação de PAS. **A.** As células cotiledonares de embriões somáticos, crescidos em meio de cultura suplementado com 0,0 g/L de sorbitol e 3 g/L de carvão ativado, apresentaram uma quantidade reduzida de grãos de amido. Nas células da protoderme, os grãos de amido não foram observados (*). **B.** Nas células cotiledonares de embriões somáticos crescido em meio de cultura com 22 g/L de sorbitol, observou-se uma maior quantidade de grãos de amido. Observa-se que as células da protoderme apresentaram pequenos grãos de amido (setas).

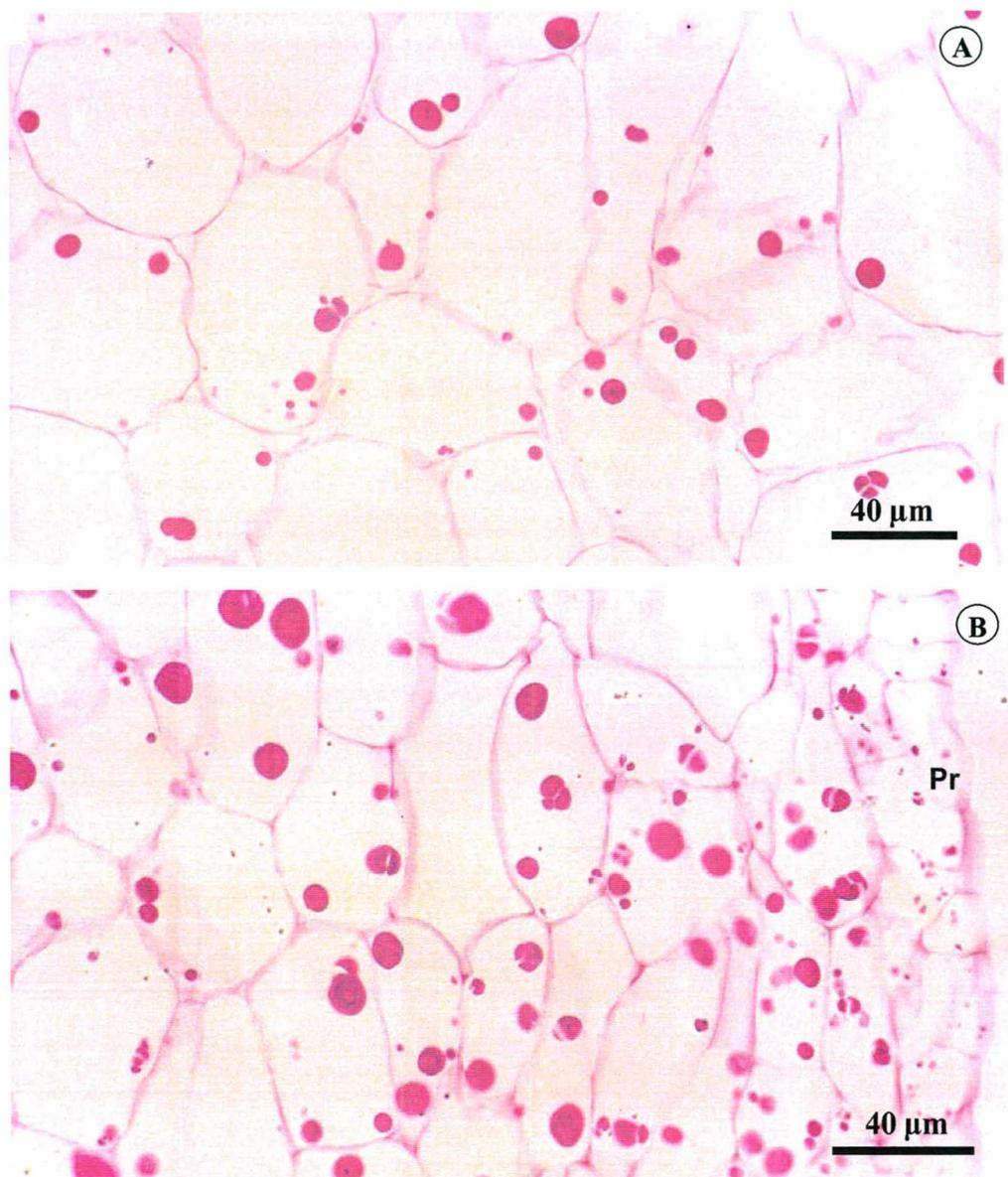


Figura 35. Embriões somáticos após 4 dias de desidratação, submetidos à reação de PAS. **A.** Observe que as células do centro do cotilédone apresentaram menor quantidade de grãos de amido, quando comparado com as periféricas do cotilédone. **B.** Células periféricas do cotilédone e células da protoderme (Pr) mostrando maior concentração de grãos de amido

5. DISCUSSÃO

5.1. Crescimento e determinação dos níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido

A curva de crescimento das culturas embriogênicas de *O. catharinensis* indicou um pequeno crescimento em matéria fresca e em matéria seca durante as duas primeiras semanas de cultura *in vitro*, período em que as culturas estavam se adaptando ao meio. A fase de crescimento exponencial das culturas embriogênicas ocorreu entre a segunda e quarta semana e o máximo crescimento em matéria fresca e matéria seca foram observados na quarta semana. A fase estacionária ocorreu entre a quarta e quinta semana, o que indica que o meio, após esse período, estava exaurido em relação à fonte de carboidratos, uma vez que os mesmos já foram utilizados e ou metabolizados pelas culturas embriogênicas. Lulsdorf *et al.* (1992) também observaram que para a espécie *Picea glauca-engelmannii*, a entrada das culturas embriogênicas na fase estacionária ocasionou um declínio na concentração da biomassa das mesmas. Segundo este mesmo autor, a fonte de carboidratos exaurida do meio de cultura pode ter causado a entrada das culturas na fase estacionária, provocando um decréscimo no crescimento em matéria fresca neste período. Da mesma forma, Drapeau *et al.* (1986) relatam que com o tempo de cultura *in vitro*, o decréscimo nos níveis de carboidratos no meio de cultura pode ter ocasionado o declínio na matéria seca em *Dioscorea deltoidea*. O aumento significativo na quantidade de água também pode ter influenciado esta resposta, uma vez que a razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca diminuiu com o tempo de cultura *in vitro*. As culturas embriogênicas de *O. catharinensis* foram subcultivadas durante a fase de crescimento exponencial, entre a terceira e quarta semana de cultura, mostrando melhor crescimento. Lulsdorf *et al.* (1992) também mostraram para as espécies *Picea glauca-engelmannii* e *P. mariana* Mill. a necessidade de subcultura das linhagens celulares na fase de crescimento exponencial, as quais possibilitaram condições de cultura mais estáveis.

As culturas embriogênicas de *O. catharinensis* iniciadas com embriões somáticos no estágio globular mostraram, desde o início até o final da cultura, uma dinâmica no padrão de desenvolvimento dos mesmos, apresentando variações nas

freqüências de embriões somáticos produzidos em cada estágio de desenvolvimento. Os resultados mostram, que durante o período de cultura, a freqüência de embriões somáticos globulares diminuiu e aumentaram as freqüências destes nos estágios mais avançados de desenvolvimento, o que indica que os embriões somáticos globulares inoculados inicialmente foram se desenvolvendo, passando pelos estágios globular, cotiledonar inicial, cotiledonar intermediário e maduro, bem como possibilitaram a formação de novos embriões, através da embriogênese secundária repetitiva. Segundo Gray (1996), os embriões somáticos de dicotiledôneas possuem padrão de desenvolvimento semelhante ao dos embriões zigóticos, passando pelos estágios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, como foi observado em *Robinia Mseudoacaia* L., por Han & Park (1999). Além disso, Gray (1996) mostrou que as células embriogênicas uma vez induzidas, continuam a se dividir, de uma maneira altamente organizada, formando os embriões somáticos. A embriogênese secundária é uma característica importante do sistema de embriogênese somática de *O. catharinensis*, pois permite a multiplicação e manutenção das culturas embriogênicas *in vitro* (Viana & Mantell, 1999). Em sistemas de embriogênese somática de outras espécies, como *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. (Cailloux *et al.*, 1996), *Swietenia macrophylla* King. (Maruyama & Ishii, 1999), *Tilia* spp (Chalupa, 1999) e *Persea americana* Mill. (Witjaksono *et al.*, 1999), também foi observada a embriogênese secundária.

Além disso, outra característica importante da embriogênese somática em *O. catharinensis* é a capacidade de multiplicação das culturas quando inoculadas em meio de cultura basal, livre de reguladores de crescimento vegetal (Viana & Mantell, 1999). Witjaksono *et al.* (1999) também observaram que o meio de cultura livre de reguladores de crescimento vegetal, possibilitou a manutenção *in vitro* das culturas de *Persea americanai* Mill., mantendo a capacidade de divisão celular e formação de embriões somáticos. Segundo Sita (1999), esta condição é muito importante, uma vez que algumas condições de cultura, como a utilização constante de auxinas, podem ocasionar alterações genéticas.

Os embriões somáticos de *O. catharinensis*, nos diferentes estágios de desenvolvimento, apresentaram variações na quantidade de matéria seca. Nos estágios iniciais, globular e cotiledonar inicial, e nas primeiras três semanas de cultura *in vitro*, foram observados valores máximos de matéria seca e os menores valores de teor de água. Além disso, os embriões nos estágios globular e cotiledonar

inicial, independentemente da semana de cultura, apresentaram uma tendência em ter níveis menores de água e valores máximos de matéria seca, bem como maior razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca. Um decréscimo nos valores de matéria seca foi observado em embriões somáticos nos estágios cotiledonar intermediário e maduro com três, quatro e cinco semanas de idade, diminuindo também a razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca, mostrando que estes embriões somáticos possuíam maior quantidade de água. Isto indica que nos estágios mais avançados de desenvolvimento, os embriões somáticos cresceram mais em termos de aumento de volume celular, pelo acúmulo de água, do que pelo aumento em matéria seca. Estes resultados sugerem então que as maiores razões entre peso de matéria seca/peso de matéria fresca observadas em culturas embriogênicas, nas primeiras semanas de cultura, foram devidas à predominância de embriões somáticos no estágio globular e que os menores valores observados para este parâmetro, verificados após cinco semanas de cultura, ocorreram nos casos em que aumentaram as freqüências de embriões no estágio maduro.

As análises dos níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* comprovaram variações nestes parâmetros que podem explicar as alterações em matéria seca observadas durante o crescimento das culturas. Desta forma, as culturas apresentaram, durante as primeiras semanas, níveis superiores de proteínas totais, enquanto que culturas embriogênicas com quatro e cinco semanas de idade apresentaram um decréscimo nestes níveis. Gutmann *et al.* (1996) também observaram resultados semelhantes em culturas embriogênicas de *Larix-leptoeuropeae*, as quais apresentaram níveis superiores de proteínas totais na segunda semana, diminuindo significativamente a partir desta até a quinta semana. Os resultados obtidos com a *O. catharinensis* indicam que durante as semanas iniciais, as culturas embriogênicas possivelmente estavam em intensa divisão celular, visando à multiplicação dos embriões somáticos através da embriogênese secundária. Isto é confirmado pela alta freqüência de embriões somáticos no estágio globular. A análise de proteínas totais nos embriões neste estágio indicou que, independentemente da semana de cultura *in vitro*, estes embriões apresentaram uma tendência em ter maiores níveis de proteínas, os quais diminuíram nos embriões somáticos em estágios mais avançados de desenvolvimento. Este resultado indica que os embriões no estágio globular estão em intensa divisão celular para a formação de novos embriões somáticos, enquanto

que nos embriões nos estágios cotiledonar intermediário e maduro, os tecidos encontram-se mais diferenciados, diminuindo a atividade de divisão celular, ocorrendo o crescimento, predominantemente pelo aumento do volume celular. Gutmann *et al.* (1996) mostraram que as concentrações de proteínas totais encontradas nas culturas embriogênicas durante as primeiras semanas podem refletir a porcentagem de células se dividindo ativamente, e as células com alta atividade meristemática são geralmente ricas em proteínas citoplasmáticas. A diminuição nos níveis de proteínas totais nas culturas embriogênicas de *O. catharinensis* a partir da terceira semana de cultura, pode ter ocorrido provavelmente, pela maior diferenciação destas e pelo aumento no crescimento dos embriões somáticos já formados. Estes embriões são constituídos por um maior número de células cotiledonares, as quais apresentam menor taxa de divisão celular, devido à menor quantidade de proteínas citoplasmáticas. Gutmann *et al.* (1996) também observaram que a diminuição dos níveis de proteínas, a partir da terceira semana, esteve associada com a mudança nas taxas de divisão de células embrionárias, ricas em proteínas citoplasmáticas, e com a diferenciação das células do suspensor, altamente vacuoladas. Resultados semelhantes foram constatados por Chanprame *et al.* (1998) que mostraram que embriões somáticos de soja apresentaram altos níveis de proteínas, os quais diminuíram em aproximadamente 25% durante a maturação. Entretanto, Kormuták *et al.* (1996) observaram que sementes de *Abies alba* e *Abies nordmanniana* apresentaram um maior acúmulo de proteínas chamadas de LEAs ("late embryogenesis abundant"), as quais são abundantemente produzidas no final da embriogênese zigótica de muitas espécies durante a fase de maturação dos embriões.

Os maiores níveis de açúcares solúveis totais, observados nas culturas embriogênicas de *O. catharinensis* durante as duas primeiras semanas, podem ter ocorrido devido à maior disponibilidade de carboidratos, sacarose e sorbitol, os quais foram metabolizados pelas culturas, aumentando os níveis internos de açúcares solúveis. Cailloux *et al.* (1996) dão suporte a esta hipótese, pois observaram que, quando no meio de cultura existe uma fonte abundante de carbono, a acumulação de açúcares nos embriões somáticos pode ser interpretada como um resultado normal da rota metabólica. Segundo Ross *et al.* (1994), o crescimento *In vitro* de tecidos vegetais normalmente requer uma fonte externa de carbono, a qual geralmente é suplementada ao meio de cultura na forma de sacarose. Uma parte da

sacarose no meio pode ser, primeiramente, degradada extracelularmente e as hexoses resultantes são absorvidas pelas células. Assim, a sacarose é uma importante fonte de estocagem de hexoses, e é, normalmente, a principal fonte de carbono como substrato para a síntese de polissacarídeos estruturais e de reserva (Ross *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2000). Além disso, segundo Lai & McKersie (1994), a sacarose pode ser utilizada como a principal fonte de energia para a formação, *in vitro*, dos embriões somáticos. Os níveis de açúcares solúveis totais diminuíram com o tempo de cultura nas culturas embriogênicas de *O. catharinensis* e, este resultado indica uma possível utilização destes açúcares solúveis totais para a síntese e armazenamento de amido.

Os níveis de açúcares solúveis totais variaram em embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento. Os resultados mostraram que apesar do declínio nos níveis de açúcares solúveis totais com o tempo de cultura, os embriões somáticos nos estágios cotiledonar intermediário e maduro apresentaram maiores níveis quando comparados com os estágios globular e cotiledonar inicial, devido, possivelmente, ao processo de maturação, que deve estar ocorrendo nestes embriões e que pode resultar no acúmulo de alguns tipos de açúcares solúveis. Segundo Horbowicz *et al.* (1995), os elevados níveis de açúcares em embriões somáticos de *Medicago sativa*, em todos os estágios de desenvolvimento, são um reflexo das altas concentrações de carbono no meio de cultura utilizado. Bewley & Black (1994) observaram uma variação nos tipos e nas concentrações de certos açúcares, mono ou oligossacarídeos, durante o desenvolvimento das sementes de muitas espécies. Nos estágios iniciais, geralmente, a presença de monossacarídeos como glicose, manose e frutose predominam, enquanto que nos estágios mais desenvolvidos, quando os embriões estão em processo de maturação, as concentrações de certos açúcares e oligossacarídeos como a estaquiose e rafinose, aumentam em associação com a tolerância à desidratação. Desta forma, apesar de não terem sido determinados os tipos de açúcares solúveis presentes nos embriões somáticos de *O. catharinensis*, é possível que os embriões somáticos nos estágios cotiledonar intermediário e maduro estavam acumulando os oligossacarídeos, processo que ocorre durante a maturação destes embriões. A importância dos oligossacarídeos na maturação, é que estes podem desencadear uma rota para promover a vitrificação da água e, conseqüentemente, promover a proteção de estruturas citosólicas. Além disso, estes compostos facilitam a estabilização de

lipídios e proteínas nas membranas celulares (Bewley & Black, 1994). Blackman *et al.* (1992) também mostraram que o acúmulo de carboidratos solúveis durante o desenvolvimento de embriões somáticos de soja, foi considerado importante para conferir tolerância à desidratação.

Os níveis de amido nas culturas embriogênicas de *O. catharinensis* diminuíram significativamente nas duas primeiras semanas. Esta diminuição esteve possivelmente associada com a mobilização do amido pelas mesmas, durante a sua adaptação ao ambiente de cultura, para suportar a fase exponencial de crescimento. A partir da terceira semana até o final do período de cultura *in vitro*, foram observados aumentos significativos nos níveis de amido das culturas embriogênicas, os quais podem ser decorrentes da utilização dos níveis internos de açúcares solúveis totais para a síntese. Bewley & Black (1994) dão suporte a esta hipótese, mostrando que se os açúcares não são utilizados diretamente para o metabolismo de energia, eles são transformados em amido, como substância de reserva nos cotilédones. A sacarose é a principal fonte para a síntese de amido em sementes (Martin *et al.*, 2000; Bewley & Black, 1994), sendo inicialmente convertida em frutose a qual, através da fosforilação pela frutose-6-fosfato, passa para glicose-1-fosfato e é então convertida em amido.

Os níveis de amido em embriões somáticos de *O. catharinensis* estiveram relacionados com os estágios de desenvolvimento dos mesmos. Foi observada uma tendência, em embriões somáticos nos estágios cotiledonar intermediário e maduro, de apresentarem níveis maiores, indicando que estes embriões estavam acumulando amido como substância de reserva. Bewley & Black (1994) dão suporte a este resultado mostrando que durante a fase de maturação das sementes ocorre um acúmulo de substâncias de reserva, como o amido.

Segundo Han & Park (1999), a concentração e o tipo de carboidrato no meio de cultura afetam muitos aspectos da embriogênese somática, incluindo o controle da germinação precoce, indução da competência em células não embriogênicas e a promoção da embriogênese secundária. A presença de sacarose combinada com diferentes concentrações de sorbitol e com a adição ou não de carvão ativado induziram variações nos valores de crescimento em matéria fresca e matéria seca e na razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca das culturas embriogênicas de *O. catharinensis*. A suplementação do meio com carvão ativado pareceu ter exercido efeito negativo no incremento em matéria fresca e matéria seca das

culturas embriogênicas. Estes resultados não estão de acordo com os obtidos por Carraway & Merkle (1997). Tais autores observaram que a adição de carvão ativado ao meio de cultura WPM promoveu um incremento em matéria fresca nos embriões somáticos de *Castanea dentata*. Culturas embriogênicas de *O. catharinensis* cultivadas em meio com 22 g.L⁻¹ de sorbitol e sem carvão ativado também apresentaram menor crescimento em matéria fresca, apresentando entretanto, maior crescimento em matéria seca. Este resultado pode estar indicando que esta concentração de sorbitol pode ter ocasionado um estresse osmótico nos embriões, através da diminuição do potencial osmótico do meio de cultura, e pode ter promovido maior acúmulo de substâncias de reserva, como amido. Schuller & Reuther (1993) e Kuo *et al.* (1997) dão suporte a esta hipótese, pois estes autores observaram que as concentrações de carboidratos no meio de cultura apresentaram efeitos na matéria seca, sendo que foi observado aumento deste parâmetro com o aumento dos níveis de carboidratos utilizados. Witajksono *et al.* (1999), também observaram que diferentes fontes de carbono afetaram o crescimento das culturas embriogênicas de *Persea americana* Mill. Entretanto, ainda não está claro como o estresse osmótico influencia o processo da embriogênese somática. Jain *et al.* (1997) observou que os carboidratos, usados como agentes osmóticos, reduzem o conteúdo de água e o crescimento de calos, tornando os tecidos mais compactos e embriogênicos.

A concentração de sorbitol e a presença ou não de carvão ativado afetaram as frequências dos embriões somáticos de *O. catharinensis* em diferentes estágios de desenvolvimento. A presença do carvão ativado combinado com concentrações de sorbitol de 2,75 a 11 g.L⁻¹ fizeram com que as maiores porcentagens de embriões somáticos permanecessem no estágio globular. Carraway & Merkle (1997) e Cailloux *et al.* (1996) também observaram variação na frequência de embriões somáticos quando testaram diferentes concentrações de carboidratos. Além disso, conforme a concentração utilizada, observaram variações em relação à capacidade das culturas em produzir embriões somáticos em determinados estágios de desenvolvimento. Para *Hevea brasiliensis* Mull. Arg., o desenvolvimento de embriões somáticos no estágio globular foi maior com o aumento da concentração de sacarose, os quais evoluíram para o estágio torpedo após quatro semanas no meio de cultura (Cailloux *et al.*, 1996). Em *Castanea dentata*, a sacarose promoveu o desenvolvimento de maior número de embriões no estágio cotiledonar do que a frutose (Carraway &

Merkle, 1997). De alguma forma, o carvão ativado influenciou a resposta morfogênica dos embriões somáticos de *O. catharinensis*, devido a alguma reação mediada por este composto. George (1996) mostrou que um efeito vantajoso do uso de carvão ativado é a adsorção de compostos fenólicos produzidos pelos tecidos vegetais. Estudos recentes também mostraram que o carvão ativado acidifica o meio de cultura durante a autoclavagem e o pH mais baixo ocasiona a hidrólise ácida da sacarose em aproximadamente 90% (Druart & De Wulf, 1993), ocasionando aumento nos níveis de glicose e frutose e segundo estes autores, a frutose tem sido identificada como inibidor do crescimento *in vitro* para algumas espécies.

Além disso, os embriões somáticos de *O. catharinensis* apresentaram-se mais opacos em meio de cultura contendo a maior concentração de sorbitol (22 g.L^{-1}) e na ausência de carvão ativado, enquanto nos demais tratamentos, os embriões somáticos apresentaram aspecto translúcido. Estes resultados indicam que a maior concentração de sorbitol sem carvão ativado pode ter proporcionado maior acúmulo de substâncias de reserva. Witjaksono *et al.* (1999) também observaram um aumento no número de embriões somáticos de *Persea americana* Mill. com aspecto branco-opacos, com o aumento da concentração de sacarose (90 g.L^{-1}) no meio de cultura. O aspecto dos embriões somáticos é um fator importante considerado na caracterização de embriões somáticos maduros e na conversão de embriões somáticos em plantas. Segundo Bewley & Black (1994) e Tulecke & McGranahan (1985), embriões somáticos translúcidos podem refletir uma deficiência no conteúdo de substâncias de reserva, como amido e proteínas. O acúmulo destas substâncias de reserva é uma etapa fundamental na embriogênese zigótica e durante a germinação, tais compostos são utilizados pelo embrião, até a planta se tornar autotrófica (Bewley & Black, 1994). Estes produtos de reserva são excelentes marcadores da qualidade fisiológica dos embriões somáticos, uma vez que o seu acúmulo é uma etapa normal e importante do desenvolvimento embrionário (Cailloux *et al.*, 1996). Feirer *et al.* (1989) sugerem que a falta de substâncias de reserva como triglicerídeos afetam os estágios finais de desenvolvimento e a subsequente conversão dos embriões somáticos em plantas. A capacidade de germinação de embriões somáticos de nozes foi maior quando estes apresentaram aspecto branco-opaco, enquanto que embriões somáticos com aspecto translúcido foram incapazes de germinar (Deng & Cornu, 1992). Carraway & Merkle (1997) e Han & Park (1999) também mostraram que a fonte de carbono e a sua concentração são importantes

no desenvolvimento, maturação e conversão dos embriões somáticos em plantas. Odjakova & Conger (1999) observaram que o desenvolvimento de embriões somáticos pode ser promovido pelo tratamento com altos níveis de carboidratos, como manitol, sacarose e sorbitol, e que a suplementação do meio de cultura com agentes osmóticos aumenta a embriogênese. Segundo estes autores, o aumento na resposta do potencial embriogênico com o uso de agentes osmóticos, como por exemplo o sorbitol e manitol, pode estar associado ao aumento do suplemento de carbono e à mudança no potencial osmótico. Muitos sistemas de embriogênese somática de espécies florestais têm sido otimizados adotando-se a desidratação e ou, aplicações de agentes osmóticos para resolver problemas referentes à maturação e germinação dos embriões somáticos (Etienne *et al.*, 1993; Reidiboym-Talleux *et al.*, 1999). Carboidratos e agentes osmóticos de alto peso molecular são necessários para o desenvolvimento normal dos embriões somáticos em muitas coníferas (Salajova *et al.*, 1999). Segundo Etienne *et al.* (1993), a adição ao meio de cultura de substâncias com atividade osmótica como o sorbitol e/ou o ácido abscísico (ABA), podem simular eventos bioquímicos que ocorrem naturalmente no óvulo.

As concentrações de sorbitol, juntamente com a suplementação do meio de cultura com sacarose e presença ou não de carvão ativado, tiveram efeitos sobre os níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido nas culturas embriogênicas de *O. catharinensis*. Níveis máximos de sorbitol, com ou sem carvão ativado, parecem ter exercido efeito negativo na síntese de proteínas totais. Estes resultados não estão de acordo com os obtidos por Etienne *et al.* (1993). Estes autores observaram, em embriões somáticos de *Hevea brasiliensis* Mull. Arg., que a adição de sacarose ao meio de cultura, juntamente com ABA, promoveram maior acúmulo de proteínas de reservas.

O meio de cultura WPM suplementado com sorbitol e carvão ativado possibilitou maior acúmulo de açúcares solúveis totais nas culturas embriogênicas de *O. catharinensis*, mostrando o efeito promotor, principalmente do carvão ativado. Segundo Canhoto & Cruz (1994), uma longa exposição dos explantes embriogênicos a altos níveis de sacarose ou sorbitol pode contribuir para uma melhor germinação, por favorecer a iniciação de mudanças bioquímicas e morfológicas responsáveis por este processo. Como já foi citado anteriormente, o carvão ativado ao ser autoclavado, provoca a hidrólise ácida da sacarose e,

possivelmente, pode ter influenciado na hidrólise do sorbitol. Talvez esta reação, de alguma forma, tenha favorecido o metabolismo dos açúcares disponíveis no meio de cultura pelos embriões somáticos de *O. catharinensis*, aumentando os níveis de açúcares solúveis totais. Além disso, segundo Wann *et al.* (1997), o carvão pode ter efeito promotor de crescimento pela capacidade de adsorção de substâncias inibitórias presentes no meio, produzidas a partir da autoclavagem deste, ou pelas próprias culturas.

Os níveis de amido apresentaram tendência de aumentar com o aumento das concentrações de sorbitol no meio de cultura. Entretanto, ao contrário do que ocorreu para os açúcares solúveis totais, o carvão ativado provocou uma redução nos níveis de amido, para todas as concentrações de sorbitol utilizadas, indicando que pode estar adsorvendo substâncias necessárias para a síntese do amido. Isto pode estar relacionado com o efeito de adsorção do carvão, pois além de outros fatores, o carvão pode adsorver componentes do meio de cultura, como as vitaminas, citocininas e auxinas (Druart & Wulf, 1993).

O estresse osmótico atua no controle de muitos processos durante a embriogênese e a germinação de embriões zigóticos (Find, 1997). Estes processos incluem a acumulação de proteínas de reserva, açúcares e amido, e a manutenção dos embriões em estágio de maturação, pela prevenção da germinação precoce. Segundo Howell (1998), durante o estágio de maturação, as sementes em desenvolvimento acumulam grandes quantidades de macromoléculas de reserva, como proteínas, lipídios e carboidratos. Algumas das proteínas de reserva servem como fonte de nutrição para o desenvolvimento do embrião, enquanto outras estão envolvidas nas funções biossintéticas. Segundo Viana (1998), a suplementação do meio de cultura com agentes osmóticos pode provocar a desidratação dos embriões somáticos e no caso da *O. catharinensis*, o nível de sorbitol, utilizado no meio de multiplicação, pode estar desencadeando rotas que iniciam a indução de tolerância à desidratação nos embriões.

A tolerância à desidratação deve-se a mudanças fisiológicas e morfológicas, incluindo a síntese de substâncias protetoras específicas nos estágios finais de desenvolvimento do embrião (Bewley & Black, 1994). Segundo estes autores, nas sementes em maturação de muitas espécies, as concentrações de certos açúcares e oligossacarídeos aumentam em associação com a indução de tolerância à desidratação e na fase inicial de perda de água pelas mesmas. Em embriões

somáticos de *O. catharinensis*, Viana (1998) observou o efeito promotor da desidratação lenta sobre a germinação. Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que ao final do quarto dia de desidratação, os embriões somáticos de *O. catharinensis* reduziram em 39% a quantidade de matéria fresca, sendo que esta redução foi maior no primeiro dia e tendeu a um equilíbrio entre o terceiro e quarto dias. Esta redução em matéria fresca correspondeu à perda de água e à possível diminuição da matéria seca, decorrente do metabolismo dos embriões somáticos na ausência do meio de cultura.

A desidratação é um requerimento natural para a maturação de muitas espécies e, durante a maturação, as sementes podem reduzir o seu conteúdo de água de 5 a 10% da sua matéria fresca (Ooms *et al.*, 1994). Segundo Bewley & Black (1994), as sementes não são capazes de tolerar a desidratação em todos os estágios durante o seu desenvolvimento, mas a tolerância à desidratação aumenta progressivamente durante o desenvolvimento do embrião. A utilização de embriões somáticos maduros desidratados em placas de Petri por um período de 4 dias estimulou a taxa máxima de germinação destes embriões (30 a 40%), quando comparado com os outros tratamentos de desidratação testados (Viana, 1998). Os resultados obtidos por este autor mostraram que a germinação dos embriões somáticos de *O. catharinensis* é dependente da desidratação e o mínimo decréscimo na matéria fresca, necessário para promover a germinação, foi de 12 a 15%. Similarmente, muitos sistemas de embriogênese somática para espécies florestais têm sido otimizados adotando-se a desidratação e/ou a aplicação de ABA para superar problemas relacionados com a maturação e germinação de embriões somáticos (Attree *et al.*, 1991; Merckle, 1990).

Os tratamentos de desidratação são aplicados usualmente pela suplementação do meio de cultura com agentes osmóticos ou pela exposição dos embriões somáticos a um estresse mátrico sobre papel filtro (Viana, 1998). A desidratação lenta resultou num aumento da taxa de germinação dos embriões somáticos de *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. e foi mais efetiva em estimular a conversão destes embriões em plantas, quando comparada com a desidratação rápida (Etienne *et al.*, 1993). Resultados semelhantes também foram obtidos para *Brassica napus* L. (Senaratna *et al.*, 1991) e para coníferas (Roberts *et al.*, 1991). Estes autores sugerem que o processo de desidratação rápida não promoveu o

acúmulo de reservas requeridas para desenvolvimento contínuo dos embriões imaturos.

Durante o período de desidratação dos embriões somáticos de *O. catharinensis* foram observadas mudanças bioquímicas. Aumentos nos níveis de proteínas totais, durante o segundo e terceiro dias de desidratação indicam que, durante este período, pode estar ocorrendo um aumento nos níveis de algumas proteínas. Kormuták *et al.* (1996) observaram que em sementes de *Abies alba* e *Abies nordmanniana* houve um maior acúmulo de proteínas da classe LEAs, as quais são produzidas no final da embriogênese zigótica em muitas outras espécies. Segundo Zimmerman (1993) estas proteínas, supostamente, desencadeiam a proteção do embrião durante a desidratação. Os resultados obtidos em *O. catharinensis* estão de acordo com os obtidos por Etienne *et al.* (1993). Estes autores mostraram que embriões somáticos de *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. também aumentaram os níveis de proteínas, quando desidratados lentamente, em comparação com a não e/ou com a rápida desidratação.

Ao contrário do que foi observado para proteínas totais, os embriões somáticos de *O. catharinensis* diminuíram os níveis de açúcares solúveis totais com o período de desidratação, indicando que estes embriões podem estar utilizando estes açúcares para o metabolismo e produção de energia. Este resultado está de acordo com a observação de Bewley & Black (1994). Além disso, Horbowicz *et al.* (1995) observaram que embriões somáticos maduros de *Medicago sativa* L. apresentaram declínio significativo nos níveis de açúcares solúveis durante a desidratação. Segundo estes autores, a indução da tolerância á desidratação destes embriões somáticos foi associada com a diminuição dos níveis de sacarose e com um aumento dos níveis de estaquiose nos embriões somáticos.

Os embriões somáticos de *O. catharinensis*, sem desidratar, apresentaram níveis superiores de amido, não diferindo estatisticamente de embriões com um, três e quatro dias de desidratação. Isto mostra que uma utilização maior do amido pelos embriões somáticos de *O. catharinensis* não ocorreu, possivelmente devido ao consumo dos açúcares solúveis totais, como visto anteriormente. Entretanto, Etienne *et al.* (1993) observaram que embriões somáticos de *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. aumentaram os níveis de amido quando foram submetidos á desidratação lenta, além deste fator estimular a conversão destes em plantas, quando comparado com a desidratação rápida. Uma desidratação muito rápida pode ocasionar danos nas

membranas celulares, ao passo que a desidratação lenta pode prevenir estes danos através da síntese de proteínas LEAs e oligossacarídeos. Segundo Horbowicz *et al.* (1995), o baixo vigor de embriões somáticos desidratados é uma consequência de maturação imprópria, que pode ter causado a acumulação inadequada de reservas, pobre desenvolvimento morfológico, danos causados pela desidratação e reidratação, ou insuficiente tolerância à desidratação. Em muitos casos, esta baixa taxa de conversão pode ser também atribuída a fatores como a não sincronização no desenvolvimento dos embriões, a possibilidade de mutações e/ou de fatores hormonais e nutricionais estarem bloqueando o desenvolvimento normal dos embriões somáticos. A maturação e a germinação dos embriões somáticos são etapas limitantes no sistema de embriogênese somática para muitas espécies, como a *Vitis* sp (Goebel-Tourand *et al.*, 1993), *Swietenia macrophylla* King. (Maruyama & Ishii, 1999), *Eucalyptus grandis* e *E. dunni* (Watt *et al.*, 1999), *Hoheria angustifoliai* Raoul (Darrow *et al.*, 1999) e *Persea americana* Mill. (Witjaksono *et al.*, 1999), determinando baixas taxas de conversão de embriões somáticos em plantas.

A relação observada entre o estágio de desenvolvimento do embrião somático, utilizado para iniciar as culturas, e as taxas de oxidação indicam que, quanto maior a diferenciação destes embriões, menor foi a sua adaptação ao novo ambiente, ocasionando a liberação de compostos fenólicos para o meio de cultura, e promovendo altas taxas de oxidação. Segundo George (1996), a oxidação ocorre devido à exudação de compostos fenólicos, que causam o escurecimento do meio e a inibição do crescimento das culturas *in vitro*. A oxidação é genótipo dependente. Os resultados de análises citoquímicas de enzimas, realizadas para embriões somáticos de *O. catharinensis*, indicaram atividades intensas de polifenoloxidasas nas células secretoras presentes nos cotilédones, assim como os testes para esterases mostraram que tais células produzem compostos fenólicos (Viana & Mantell, 1999).

O estágio de desenvolvimento e tamanho dos embriões somáticos utilizados na subcultura também influenciaram o potencial de embriogênese secundária em *O. catharinensis*. Os resultados indicaram que, quanto maior a diferenciação dos embriões utilizados na subcultura, menor foi a capacidade de divisão celular. Ao inocular embriões somáticos no estágio globular (≤ 2 mm) foram obtidos embriões somáticos em todos os estágios de desenvolvimento e ao inocular embriões, principalmente no estágio maduro (≥ 5 mm), estes praticamente não apresentaram

a capacidade de embriogênese secundária. Para a *Castanea dentata*, também foi observada esta relação entre o tamanho do embrião zigótico e a resposta embriogênica. Para esta espécie, Carraway & Merkle (1997) observaram que a utilização de embriões zigóticos maiores do que 5 mm de comprimento não resultou na produção de culturas embriogênicas, bem como eixos embrionários, provenientes de embriões zigóticos, após o estágio cotiledonar de desenvolvimento não desenvolveram embriogênese somática. Em geral, o potencial dos explantes de embriões zigóticos imaturos em formar culturas embriogênicas é influenciado pelo seu estágio de desenvolvimento e, geralmente, estágios mais jovens são mais eficientes do que estágios mais maduros. A castanha pareceu seguir este padrão (Carraway & Merkle, 1997). Estes autores também relacionaram as respostas não embriogênicas dos embriões zigóticos de *Castanea dentata* com o acúmulo de substâncias de reserva, que se inicia no estágio cotiledonar. Sotak *et al.* (1991) também observaram que o potencial embriogênico de embriões zigóticos de *Liriodendron tulipifera* decresceu com o acúmulo de proteínas de reserva, sendo que Roberts *et al.* (1991) observaram resultados semelhantes em embriões zigóticos de *Picea glauca* e *Picea engelmannii*.

Os estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *O. catharinensis* também influenciaram o crescimento em matéria fresca e matéria seca das culturas embriogênicas. Culturas iniciadas com embriões somáticos no estágio globular apresentaram maior crescimento em matéria fresca e matéria seca, enquanto que as iniciadas com embriões somáticos no estágio maduro apresentaram menores aumentos nestes parâmetros. Isto indica que, quanto menor e menos diferenciado for o embrião somático, maior a capacidade de divisão celular e de embriogênese secundária, possibilitando a multiplicação e crescimento *in vitro* das culturas embriogênicas.

5.2. Caracterização morfológica e histoquímica

Quatro estágios de desenvolvimento foram definidos em embriões somáticos de *O. catharinensis* baseados nas suas características morfológicas e histoquímicas, bem como, no seu tamanho. Segundo Yeung (1995), o estágio globular da embriogênese somática marca o início da diferenciação estrutural, de modo que a

histogênese inicia com a formação da protoderme circundando o embrião somático globular. A transição do estágio globular para cotiledonar inicial em embriões somáticos de *O. catharinensis* foi marcada pela alteração do crescimento isodiamétrico para a simetria bilateral, indicando o início do desenvolvimento e expansão dos dois cotilédones e diferenciação do meristema apical da raiz. O desenvolvimento destes continua até o estágio maduro, com a expansão dos cotilédones, pela proliferação celular e também pelo aumento do volume celular resultante da expansão do vacúolo. Além disso, durante o desenvolvimento dos embriões somáticos, foi observada a presença de células meristemáticas na região apical do ramo e diferenciação do procâmbio nos dois cotilédones. Embriões somáticos de *Vitis vinifera* no estágio torpedo apresentaram uma simetria bilateral associada com a formação dos cotilédones (Goebel-Tourand *et al.*, 1993). Ribas *et al.* (2000) também observaram a transição de embriões somáticos do estágio globular para o cotiledonar, as quais foram baseadas, também, na diferenciação dos feixes vasculares do procâmbio e no desenvolvimento dos cotilédones, caracterizado pela maior vacuolização das células cotiledonares. Embriões somáticos e zigóticos de *Tilia cordata* também apresentaram a diferenciação do procâmbio no centro dos dois cotilédones (Kärkönen, 2000). Entretanto, ao contrário do que foi observado para a *O. catharinensis*, embriões somáticos de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg.) não foram capazes de emitir a raiz e o ápice do ramo, ocasionando a necrose dos mesmos (Ribas *et al.*, 2000). Resultado semelhante foi observado por Pliego-Alfaro & Murashigue (1987), os quais observaram, através de análises morfológicas e histoquímicas, que os meristemas apicais da raiz e do ramo frequentemente não estavam desenvolvidos em embriões somáticos de *Persea americana* Mill.

Nas análises morfológicas, pode ser observado que os embriões somáticos de *O. catharinensis* apresentaram desenvolvimento normal em relação aos cotilédones e ao meristema apical da raiz. Entretanto para esta espécie, Viana & Mantell (1999) observaram que embriões somáticos germinados não apresentaram o desenvolvimento do meristema apical do ramo, mas somente do meristema apical da raiz. Dodeman *et al.* (1997) mostraram que os meristemas primários têm que estar formados para que a embriogênese somática seja concluída e, segundo Ribas *et al.* (2000), a exigência mais importante para que ocorra a conversão de embriões

somáticos em plantas é a obtenção de embriões maduros e totalmente desenvolvidos.

As análises morfológicas também revelaram que os embriões somáticos de *O. catharinensis* apresentaram células com características meristemáticas na região apical do ramo, entre os dois cotilédones, as quais reagiram positivamente ao CBB, evidenciando grande quantidade de proteínas citoplasmáticas. Segundo Howell (1998), o meristema apical do ramo forma-se entre os cotilédones e é composto por células pequenas e com citoplasma denso. As células meristemáticas apicais da raiz de *O. catharinensis* são células pequenas, de forma isodiamétrica, com conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, pouco vacúolo e presença de grãos de amido. Características semelhantes foram observadas por Ribas *et al.* (2000) em *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg. e por Goebel-Tourand *et al.* (1993) em *Vitis vinifera*. Segundo Tautorus *et al.* (1991), a abundância de organelas é um indicador de crescimento celular e, deste modo, a atividade mitótica é uma propriedade essencial das células embriogênicas.

Entretanto, o meristema apical do ramo nos embriões somáticos de *O. catharinensis*, parece pobremente organizado, não apresentando também acúmulo de amido; isto pode explicar o não desenvolvimento de plantas completas durante a germinação. Goebel-Tourand *et al.* (1993) também observaram, em embriões somáticos de *Vitis vinifera*, o desenvolvimento de meristema apical do ramo parcialmente organizado, com células em diferenciação e atividade mitótica desorientada. A embriogênese somática em muitas espécies também é limitada pelo não desenvolvimento do meristema apical do ramo, como é o caso de *Borago officinalis* (Quinn *et al.*, 1989), *Vitis* (Faure, 1990), *Theobroma cacao* (Alemanno *et al.*, 1996), *Pisum sativum* (Loiseau *et al.*, 1998) e *Persea americana* (Witjaksono *et al.*, 1999).

Segundo Howell (1998), a formação dos meristemas apical da raiz e apical do ramo é um evento crucial no desenvolvimento do embrião. Este autor sugere que apesar dos embriões serem morfológicamente simples, estes são molecularmente complexos, e a expressão do gene é um dos primeiros indicadores moleculares da polaridade na transição do embrião globular esférico para a simetria bilateral do embrião, com o desenvolvimento dos cotilédones. Segundo este mesmo autor, muitos genes mutantes estão relacionados ao não desenvolvimento dos meristemas apicais, sendo que alguns deles afetam as primeiras divisões dos embriões nos

estágios iniciais e outros falham na organização do meristema apical do ramo, durante a embriogênese, nos estágios intermediários a finais. Desta forma, os embriões somáticos podem apresentar características morfológicas normais e serem anormais em termos de diferenciação de células e tecidos, bem como ao nível de expressão gênica durante o desenvolvimento. Gupta *et al.* (1991) afirmam que os embriões somáticos devem apresentar a morfologia externa normal e características internas semelhantes às dos embriões zigóticos, para conversão em plantas completas.

Kärkönen (2000) observou que alguns reguladores de crescimento vegetal apresentam efeitos positivos no desenvolvimento do meristema apical do ramo. Segundo este mesmo autor, maior número de embriões somáticos de *Tilia cordata* apresentaram meristemas apicais do ramo mais desenvolvidos quando estes embriões foram crescidos em meio de cultura contendo ABA, propiciando melhor germinação quando comparado com o meio sem ABA, sendo que este regulador parece exercer uma rota importante na histodiferenciação. Segundo Salajova *et al.* (1999), as mudanças morfológicas que acompanham o desenvolvimento de embriões somáticos em *Pinus nigra*, promovidos pela aplicação de agentes osmóticos como o ABA, estão associados com a expressão genética, síntese de proteínas e acúmulo de proteínas padrões. Estes mesmos autores sugerem que os agentes osmóticos e o ABA influenciam a organização interna dos embriões somáticos em desenvolvimento. O balanço hormonal controla o crescimento, diferenciação e desenvolvimento dos embriões somáticos e, através de um acompanhamento histoquímico durante o desenvolvimento destes embriões, é possível identificar os fatores associados ao controle da embriogênese somática (Goebel-Tourand *et al.*, 1993). A baixa taxa de germinação dos embriões somáticos de *O. catharinensis* pode estar indicando a necessidade de estudos com reguladores de crescimento vegetal que possam vir a promover a diferenciação do meristema apical do ramo.

As análises morfológicas mostraram também que o desenvolvimento de novos embriões somáticos em *O. catharinensis*, via embriogênese secundária, ocorre a partir de células da região do meristema apical de raiz, revelando que esta região apresenta células com alta capacidade proliferativa. Isto confirma os resultados observados por Viana & Mantell (1999) onde a embriogênese secundária ocorria nesta região dos embriões somáticos. A região do meristema apical da raiz

apresenta células com intensa atividade mitótica, as quais devem estar envolvidas na formação de embriões somáticos secundários. Entretanto, a região de ocorrência da embriogênese secundária é variável conforme a espécie. Para algumas espécies como *Theobroma cacao* (Alemanno *et al.*, 1996) e *Quercus suber* (El Maâtaoui *et al.*, 1990) os embriões secundários são formados a partir de células da camada epidérmica e sub-epidérmica, enquanto que em *Aspidosperma polyneuron* (Ribas *et al.*, 2000) estes são formados a partir de células do hipocótilo e em *Feijoa sellowiana* (Canhoto & Cruz, 1996) são produzidos a partir da superfície adaxial dos cotilédones.

Segundo Gupta *et al.* (1991), os embriões somáticos apresentam características internas semelhantes às dos embriões zigóticos, as quais incluem os compostos de armazenamento, tais como: proteínas, lipídios e carboidratos.

As proteínas são os principais constituintes das organelas celulares e estão presentes no citoplasma como moléculas envolvidas em diversas rotas metabólicas (Bouzon, 1999). Quando coradas com CBB, as células da região meristemática apical da raiz e apical do ramo dos embriões somáticos de *O. catharinensis* mostraram coloração de componentes protéicos distribuídos uniformemente por todo o citoplasma, indicando uma intensa síntese de organelas celulares. Esta síntese de organelas torna o citoplasma compacto e muito ativo, o que é típico de células em multiplicação e divisão celular. Além disso, algumas células do meristema radicular dos embriões somáticos de *O. catharinensis* apresentaram acúmulo de proteínas na forma de grânulos. Alemanno *et al.* (1997) também observaram grande quantidade de proteínas de reservas, as quais formavam unidades granulares e corpos protéicos em embriões zigóticos de *Theobroma cacao*. Os corpos protéicos são estruturas de proteínas de reserva, abundantes em sementes e, durante a germinação, as proteínas de reserva destes corpos protéicos são hidrolizadas em aminoácidos e exportados para o citosol para serem usados na síntese de proteínas (Taiz & Zeiger, 1998). Nas células cotiledonares e do procâmbio de embriões somáticos de *O. catharinensis*, a reação positiva ao CBB é confinada à região nuclear e perinuclear, onde ficam concentradas as organelas celulares. O restante do citoplasma destas células reagiu com menor intensidade, mostrando menor concentração de organelas citoplasmáticas. Isto fica mais evidente com a evolução dos estágios de desenvolvimento, onde estas células cotiledonares apresentam vacúolos maiores, diminuindo a presença de organelas citoplasmáticas nos

embriões dos estágios cotiledonar intermediário e maduro. Isto pode estar relacionado também com a redução nos níveis de proteínas totais nos embriões somáticos destes estágios, observados através das análises bioquímicas realizadas.

Os métodos específicos utilizados para identificar os diferentes tipos de polissacarídeos mostraram uma localização diferenciada dos compostos ácidos e neutros em embriões somáticos de *O. catharinensis*. Os polissacarídeos neutros foram localizados no meio intracelular como substâncias de reserva e na parede celular, enquanto que os polissacarídeos ácidos foram observados especialmente como constituintes da matriz da parede celular.

O fenômeno de metacromasia tem sido útil nos estudos histológicos como indicador de polissacarídeos ácidos (Gordon-Mills *et al.*, 1978). Em embriões somáticos de *O. catharinensis* foi observada uma intensa reação metacromática na parede celular das células meristemáticas, cotiledonares, do procâmbio e da protoderme, devido a presença de polissacarídeos ácidos que reagiram com o AT-O. Este resultado sugere a presença de polissacarídeos ácidos carboxilados nos embriões somáticos de *O. catharinensis*.

A reação de PAS é utilizada para a identificação de polissacarídeos neutros, porque requer a presença de grupos 1,2-glicol que são oxidados para aldeídos pelo ácido periódico (Trick & Pueschel, 1990). A parede celular apresenta reação positiva ao PAS, evidenciando a presença de polissacarídeos neutros característicos das moléculas de celulose. Estes grupos 1,2-glicol são abundantes em polissacarídeos neutros, como os grãos de amido. A intensa reação positiva ao PAS das células meristemáticas e cotiledonares dos embriões somáticos de *O. catharinensis* pode ser atribuída à grande quantidade de grãos de amido. O tamanho destes grãos de amido variou de acordo com os tipos celulares estudados. As células do procâmbio raramente apresentaram grãos de amido, concordando com os resultados obtidos por Borisjuk *et al.* (1995) em embriões zigóticos de *Vicia faba* L. As células meristemáticas e da protoderme de embriões somáticos de *O. catharinensis* apresentaram grãos de amido pequenos e em maior quantidade, enquanto que nas células cotiledonares, estes grãos de amido são maiores, aumentando a quantidade do centro para a periferia dos cotilédones. Pequenos grãos de amido nas células da protoderme e grãos de amido maiores nas células cotiledonares também foram observados por Borisjuk *et al.* (1995) em embriões zigóticos de *Vicia faba* L.

Rodriguez (1994) e Barciela & Vieitez (1993) também evidenciaram maior quantidade de grãos de amido nas camadas periféricas dos embriões somáticos.

O uso de azul de alcian foi bem documentado na literatura de histoquímica animal para diferenciar polissacarídeos ácidos sulfatados e carboxilados (Pearse, 1968). Bouzon (1993) utilizou o mesmo método em algas marinhas para distinguir polissacarídeos sulfatados, e a presença destes são observados devido a acidofilia do AB. Este teste histoquímico mostrou que os embriões somáticos de *O. catharinensis* apresentaram uma reação fraca, limitada à parede celular, evidenciando pequena quantidade de polissacarídeos ácidos sulfatados. Ao contrário, Bouzon (1993) observou, através da intensa reação pela presença de compostos ricos em grupamentos sulfatados, que polissacarídeos ácidos sulfatados são abundantes em *Gracilaria*.

Segundo Merkle *et al.* (1995), o armazenamento de lipídios pode ser considerado um indicador de que o tecido é embriogênico e, desta forma, é utilizado como marcador para avaliar a qualidade do desenvolvimento do embrião somático. O corante SB-B mostrou que as células meristemáticas da raiz dos embriões somáticos de *O. catharinensis* apresentaram reação intensa, evidenciando maior concentração de lipídios nesta região, enquanto que as células cotiledonares apresentaram reação fraca, limitada à periferia dos cotilédones. A protoderme também apresentou reação ao SB-B, evidenciando pequena quantidade de lipídios. Segundo trabalhos realizados por outros autores, o acúmulo de lipídio é observado em diferentes estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos. Nos embriões somáticos de *Elaeis guineensis* (Schwendiman *et al.*, 1988) foram observados acúmulos de lipídios no início da formação destes, enquanto que embriões somáticos de *Hevea brasiliensis* (Cailloux *et al.*, 1996) apresentaram acúmulo de lipídios nos diferentes estágios de desenvolvimento. Reidiboym-Talleux *et al.* (1999) também observaram que o acúmulo de lipídios ocorre nas células periféricas do cotilédone dos embriões somáticos.

As concentrações de sorbitol apresentaram efeito sobre a quantidade e localização dos grãos de amido em embriões somáticos de *O. catharinensis*. O acúmulo de reserva na forma de amido foi maior com o aumento da concentração de sorbitol, indicando que este aumento proporcionou uma maior síntese e acúmulo de amido nos embriões somáticos. Resultados semelhantes foram observados por Alemanno *et al.* (1997). Estes autores observaram que embriões somáticos de

Theobroma cacao apresentaram maior síntese e acúmulo de grãos de amido com a utilização de maiores concentrações de maltose e sacarose.

Através dos testes histoquímicos PAS e CBB, não foram observadas variações significativas nas quantidades de amido e proteínas totais em embriões somáticos de *O. catharinensis* durante a desidratação lenta. Entretanto, relacionado com as análises bioquímicas, foi observado um aumento não significativo de amido e aumento significativo de proteínas totais. Etienne *et al.* (1993) também observaram que a desidratação lenta ocasionou um acúmulo de amido e proteínas de reserva em embriões somáticos de *H. brasiliensis*, em comparação com os embriões somáticos não desidratados ou com a desidratação rápida dos embriões.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões sobre o sistema de embriogênese somática de *O. catharinensis*:

- 1- Culturas embriogênicas produzidas em meio de cultura padrão apresentaram crescimento lento em matérias fresca e seca nas duas primeiras semanas, apresentando máximo crescimento na quarta semana de cultura.
- 2- Culturas embriogênicas nas três primeiras semanas apresentaram maiores valores da razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca do que nas semanas finais de cultura.
- 3- Durante o período de cultura *in vitro*, as culturas embriogênicas apresentaram aumento na frequência de embriões somáticos nos estágios mais avançados de desenvolvimento e na formação de novos embriões somáticos globulares via embriogênese secundária repetitiva.
- 4- Embriões somáticos nos estágios iniciais de desenvolvimento (globular e cotiledonar inicial) independentemente da semana de cultura, apresentaram tendência em ter níveis menores de água, valores maiores de matéria seca e maior razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca.
- 5- Embriões somáticos nos estágios finais de desenvolvimento (cotiledonar intermediário e maduro) apresentaram níveis menores de matéria seca e valores da razão peso de matéria seca/peso de matéria fresca, mostrando que estes embriões somáticos possuíam maior quantidade de água.
- 6- Culturas embriogênicas nas primeiras semanas apresentaram maiores níveis de proteínas totais e açúcares solúveis totais, enquanto que os maiores níveis de amido foram observados em culturas embriogênicas na terceira, quarta e quinta semanas.
- 7- Embriões somáticos nos estágios iniciais de desenvolvimento apresentaram tendência em ter maiores níveis de proteínas totais, enquanto que embriões somáticos nos estágios cotiledonar intermediário e maduro apresentaram tendência em ter maiores níveis de açúcares solúveis totais e amido.
- 8- A adição de carvão ativado ao meio suplementado com diferentes concentrações de sorbitol exerceu efeito negativo no incremento em matéria fresca e matéria seca das culturas embriogênicas.

- 9- O meio suplementado com 22 g.L⁻¹ de sorbitol e sem carvão ativado reduziu o incremento em matéria fresca, mas promoveu o crescimento em matéria seca indicando um maior acúmulo de substâncias de reserva como o amido.
- 10-As maiores porcentagens de embriões somáticos no estágio globular foram observadas em meio suplementado com carvão ativado, combinado com 2,75 a 11 g.L⁻¹ de sorbitol.
- 11-Os embriões somáticos apresentaram-se mais opacos quando crescidos em meio contendo a maior concentração de sorbitol e na ausência de carvão ativado, enquanto que nos demais tratamentos os embriões somáticos apresentaram-se com aspecto translúcido, indicando uma possível deficiência no acúmulo de substâncias de reserva.
- 12-. Níveis máximos de sorbitol com ou sem carvão ativado, exerceram efeito negativo no acúmulo de proteínas totais, enquanto que concentrações de sorbitol combinadas com carvão ativado, promoveram maiores níveis de açúcares solúveis totais e menores níveis de amido em culturas embriogênicas, indicando o efeito positivo do carvão ativado sobre o acúmulo de açúcares solúveis totais e negativo sobre o acúmulo de amido nestas culturas.
- 13-Os embriões somáticos não apresentaram variações nos níveis de amido durante o período de desidratação. Entretanto, os níveis de açúcares solúveis totais diminuíram neste período e os de proteínas totais aumentaram após dois a três dias de desidratação.
- 14-Embriões somáticos no estágio globular foram os mais eficientes no estabelecimento de culturas embriogênicas, apresentando menores taxas de oxidação, maior crescimento em matérias fresca e seca, e frequência de embriões somáticos em todos os estágios de desenvolvimento.
- 15-Os embriões somáticos durante os estágios de desenvolvimento apresentaram a diferenciação dos cotilédones, do procâmbio e o desenvolvimento do meristema apical da raiz e meristema apical do ramo. Entretanto, o meristema apical do ramo não apresentou organização completa.
- 16- A formação de novos embriões somáticos através da embriogênese secundária repetitiva, ocorre a partir de células localizadas na região do meristema apical da raiz.
- 17- Os testes histoquímicos PAS, CBB e Sudan negro mostraram que as células meristemáticas da raiz apresentaram grande quantidade de grãos de amido de

tamanho pequeno, grande concentração de proteínas citoplasmáticas e presença de grânulos de lipídios, enquanto que as células do meristema apical do ramo praticamente não apresentaram grãos de amido.

18-As células cotiledonares apresentaram grãos de amido de tamanho maior e uma redução na reação ao CBB e SB-B indicando diminuição nos níveis de proteínas citoplasmáticas e de grânulos de lipídios nestas células, quando comparado com as células do meristema apical da raiz.

7. BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. 1996. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues of cacao. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46: 187-194.
- ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. 1997. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. *In vitro Cell Development Biology* 33:163-172.
- AMMIRATO P.V. 1983. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds.) *Handbook of plant cell culture*. Macmillan Publisher Co., New York, p.82-123.
- ARNOLD, C.D.; MITRENGA, D.; MAYRESBACH, H. 1975. Gefriertrocknung und Einbettung in Glycolmethacrylat (GMA)- Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. *Acta histochemistry* 14:271-277.
- ATTREE, S.M.; FOWKE, L. C. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35:1-35.
- ATTREE, S.M.; MOORE, D.; SAWHNEY, V.K.; FOWKE, L.C. 1991. Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryos: Effects of a nonplasmolyzing water stress and abscisic acid. *Annals of Botany* 68: 519-525.
- BARCIELA, J.; VIEITEZ, A.M. 1993. Anatomical sequence and morphometric analysis during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L. *Annals of Botany* 71:395-404.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. 2^o ed.; Plenum Press, New York. 445 p.
- BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. 1992. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiology* 100:225-230.
- BORISJUK, L.; PANITZ, H.W.; MANTEUFFEL, R.; WOBUS, U. 1995. Embryogenesis of *Vicia faba* L.: Histodifferentiation in relation to starch and storage protein synthesis. *Plant Physiology* 143: 203-218.
- BOUZON, Z. L. 1993. *Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de Hypnea musciformis (Gigartinales - Rhodophyta)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná. 66 p.
- BOUZON, Z.L. 1999. *Histoquímica e ultra-estrutura da espermatogênese e carporogênese de algas gracilarióides (Rhodophyta)*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 116 p.

- BRADFORD, M.B. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- CAILLOUX, F.; JULIEN-GUERRIER, J.; LIHOSSIER, L.; COUDRET, A. 1996. Long-term embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Science* 120:185-196.
- CANHOTO, J.M.; CRUZ, G.S. 1994. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae) by manipulation of culture media compositions. *In Vitro Cell Development* 30: 21-25.
- CANHOTO, J.M.; CRUZ, G.S. 1996. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg.) *Protoplasma* 191:34-45.
- CARRAWAY, D.T.; MERKLE, S.A. 1997. Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut. *Canadian Journal Forest Research* 27:1805-1812.
- CARVALHO, P.E.R. 1994. *Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. Colombo, EMBRAPA-CNPQ/SPI. p. 367-370.
- CHALUPA, V. 1999. Somatic embryogenesis in Linden (*Tilia* spp.). In: JAIN, S.; GUPTA, P.; NEWTON, R. (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Publishers, Netherlands, v.5, p.31-43.
- CHANPRAME, S.; KUO, T.M.; WIDHOLM, J.M. 1998. Soluble carbohydrate content of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] somatic and zygotic embryos during development. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 34:64-68.
- CIMA. 1991. *Relatório da comissão interministerial sobre desenvolvimento e meio ambiente*. Brasília, DF, Brasil.
- DARROW, H.E.; BURRITT, D.J.; BANNISTER, P. 1999. Somatic embryogenesis in *Hoheria angustifolia*. In: JAIN, S.; GUPTA, P.; NEWTON, R. (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Publishers, Netherlands, v.5, p. 135-147.
- DENG, M.D.; CORNU, D. 1992. Maturation and germination of walnut somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28:195-202.
- DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48(313): 1493-1509.
- DRAPEAU, D.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. 1986. Growth kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in batch culture. *Biotechnology Bioeng.* 28: 1555-1563.
- DRUART, P.; De WULF, O. 1993. Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32:97-99.
- EL MAËTAOUI, M.; EXPAGNAC, H.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. 1990. Histology of callogenesis induced in stem fragments of cork oak (*Quercus suber*) cultured in vitro. *Annals of Botany* 66:183-190.

- ETIENNE, H.; MONTORO, P.; MICHAUX-FERRIERE, N.; CARRON, P. 1993. Effects of desiccation, medium osmolarity and abscisic acid on the maturation of *Hevea brasiliensis* Somatic Embryos. *Journal of Experimental Botany* 267(44):1613-1619.
- FAURE, O. 1990. Embryons somatiques de *Vitis rupestris* et embryons zygotiques de *Vitis* sp.: morphologie, histologie, histochemie et développement. *Can. J. Botany*. 68:2305-2315. in: GOEBEL-TOURAND, I.; MAURO, M-C.; SOSSOUNTZOV, L.; MIGINIAC, E.; DELOIRE, A. 1993. Arrest of somatic embryo development in grapevine: histological characterization and the effect of ABA, BAP and zeatin in stimulating plantlet development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 91-103.
- FEIRER R.P.; CONKEY, J.H.; VERHAGEN, S.A. 1989. Triglycerides in embryogenic conifer calli: a comparison with zygotic embryos. *Plant Cell Reports* 8:207-209.
- FIND, J.I. 1997. Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination. *Plant Science* 128:75-83.
- Fundação SOS Mata Atlântica. 1992. *Dossiê SOS Mata Atlântica*. São Paulo, Estudos do Projeto e Edições Ltda.
- GAHAN, P. B. 1984. *Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction*. Academic Press, London, 301 p.
- GEORGE, E.F. 1996. *Plant propagation by tissue culture*. Part 2. Practice. 2 ed., Edington: Exegetics, England. 1361p.
- GOEBEL-TOURAND, I.; MAURO, M-C.; SOSSOUNTZOV, L.; MIGINIAC, E.; DELOIRE, A. 1993. Arrest of somatic embryo development in grapevine: histological characterization and the effect of ABA, BAP and zeatin in stimulating plantlet development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 91-103.
- GOMEZ, K. A.; GOMEZ, A. 1984. *Estatistical procedures for Agricultural Research*. 2nd ed., Singapore, John Wiley & Sons. 660p.
- GORDON-MILLS, E. M.; McCANDLESS, E.L. 1973. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: HARVEY, M.J.; MCLACHLAN, J. (eds) *Chondrus crispus*. Nova Scotian Institute of Science, Halifax. p. 111-133.
- GORDON-MILLS, E.M.; TAS, J.; McCANDLESS, E.L. 1978. Carrageenans in the cell wall of *Chondrus crispus* Stack. (Rhodophyceae, Gigartinales). III. Metachromasia and the topooptical reaction. *Phycologia* 17:95-104.
- GRAY, D.J. 1996. Nonzygotic embryogenesis. In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Publishers, Netherlands, v.5, p. 149-151.
- GUPTA, P.K.; TIMMIS, R.; PULLMAN, G.; YANCEY, M.; KREITINGER, M.; CARLSON, W.; CARPENTER, C. 1991. Development of an embryogenic system for automated

- propagation of forest trees. In: VASIL, I.K. (ed.) *Scale-up and automation in plant propagation*. California:Academic Press, p.75-93.
- GUTMANN, M.; von ADERKAS, P.; LABEL, F.; LELU, M-A. 1996. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *Journal of Experimental Botany* 47(305):1905-1917.
- HAN, K.-H.; PARK, Y.G. 1999. Somatic embryogenesis in black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) In: JAIN, S., GUPTA, P.; NEWTON, R. (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Publishers, Netherlands, v.5, p.149-161.
- HORBOWICZ, M.; OBENDORF, R.L.; McKERSIE, D.; VIANDS, D.R. 1995. Soluble saccharides and cyclitols in alfafa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos, leaflets and mature seeds. *Plant Science* 109: 191-198.
- HOWELL, S.H. 1998. *Molecular genetics of plant development*. 1º ed., Cambridge University Press, Australia. 365p.
- JAIN, S.M.; ISHIII, K. 1998. Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. In: MANTEL, S.H.; BRUNS, S.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. (eds.) *Recent advances in biotechnology for conservation and management*. Stockholm:International Foundation for Science, p. 214-231.
- JAIN, R.K.; DAVEY, M.R.; COCKING, E.C.; WU, R. 1997. Carbohydrate and osmotic requirements for high-frequency plant regeneration from protoplast-derived colonies of *indica* and *japonica* rice varieties. *Journal of Experimental Botany* 48:751-758.
- KÄRKÖNEN, A. 2000. Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia cordata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61:205-214.
- KORMUTÁK, A.; VOOKOVÁ, B.; GAJDOSOVÁ, A. 1996. Protein composition and embryogenic competence of developing *Abies alba* x *Abies nordmanniana* seeds. *Biologia* 51(4):425-428.
- KUO, T.M.; LOWELL, C.A.; SMITH, P.T. 1997. Changes in soluble carbohydrates and enzymic activities in maturing soybean seed tissues. *Plant Science* 125: 1-11.
- LA CLAIRE, J. W.; DAWES, C. J. 1976. An autoradiographic and histochemical localization of sulfated polysaccharides in *Eucheuma nudum* (Rhodophyta). *Journal Phycology* 12: 368-375.
- LAI, F-M.; McKERSIE, B.D. 1994. Regulation of starch and protein accumulation in alfafa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Plant Science* 100:211-219.
- LIMA, A.R.; CAPOBIANCO, J.P.R. 1997. *Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para sua conservação*. Documentos do ISA (Instituto Sócio-Ambiental), nº 4, p.5-7.
- LITZ, R.E.; CHAVEZ, V.C.; MOON, P.A. 1998. Induction of embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination. In: MANTEL, S.H.; BRUNS, S.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. (eds.)

Recent advances in biotechnology for conservation and management.
Stockholm:International Foundation for Science, p. 232-243.

- LLOYD, G.; McCOWN, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 30:421-427.
- LOISEAU, J.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; LE DEUNFF, Y. 1998. Histology of somatic embryogenesis in pea. *Plant Physiology Biochemistry* 36:683-687.
- LORDELLO, A. L. L. 1996. *Constituintes químicos de folhas e de cultura de células e tecidos de Ocotea catharinensis Mez. (Lauraceae).* Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 160 p.
- LULSDORF, M.M.; TUTORUS, T.E.; KIKCIO, S.I.; DUSTAN, D.I. 1992. Growth parameters of embryogenic suspension cultures of interior spruce (*Picea glauca-engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). *Plant Science* 82:227-234.
- MA, W.W.; KOZLOWSKI, J.F.; McLAUGHLIN, J.L. 1991. Bioactive neolignans from *Endlicheria dysodantha*. *Journal of Natural Products* 54:1153-1158.
- MARTIN, A.B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGOS, P.; HITA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. 2000. Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Science* 154:143-151.
- MARUYAMA, E.; ISHII, K. 1999. Somatic embryogenesis in Big-leaf Mahogany (*Swietenia macrophylla* King.) In: JAIN, S., GUPTA, P.; NEWTON, R. (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Publishers, Netherlands, v.5, p. 45-62.
- McCULLY, M.E. 1970. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. *Ann. N. Y. Acad. Science* 175: 702-711.
- McCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H.S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry* 22:1156-1158.
- MERKLE, S.A. 1990. Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 26: 1086-1093.
- MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; FLINN, B.S. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (ed). *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht:Kluwer Academic, p.155-203.
- MERKLE, S.A.; DEAN, J.F.D. 2000. Forest tree biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 11:298-302.
- MOURA-COSTA, P.H.; VIANA, A.M.; MANTELL, S.H. 1993. *In vitro* plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae), an endangered forest tree of S. Brasil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35:279-286.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue *O. Protoplasma* 59(2): 368-373.

- OOMS, J.J.J.; VAN DER VEEN, R.; KARSSSEN, C.M. 1994. Abscisic acid and osmotic stress or slow drying independently induce desiccation tolerance in mutant seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 92:506-510.
- ODJAKOVA, M.K.; CONGER, B.V. 1999. The influence of osmotic pretreatment and inoculum age on the initiation and regeneration of switchgrass suspension cultures. *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 35:442-444.
- PARK, Y.S.; BARRET, D.J.; BONGA, J.M. 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones, *In Vitro Cellular Development Biology-Plant* 34:231-239.
- PEARSE, A.G.E. 1968. *Histochemistry*, Theoretical and Applied., v. 1, Little, Brown & Co., Boston, 759p.
- PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGUE, T. 1987. Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12:61-66.
- QUINN, J.; SIMON, J.E.; JANICK, J. 1989. Histology of zygotic and somatic embryogenesis in borage. *Journal Amer. Soc. HortScience* 114(3): 516-520.
- RANDI, A.M.; FELIPPE, G.M. 1988. Mobilization of storage reserves during *Cyathea delgadii* spore germination. *The Botanical Magazine* 101:529-532.
- RAVETTO, C. 1964. Alcian blue – alcian yellow: a new method for the identification of different acidic groups. *Journal Histochemistry Cytochemistry* 12: 44-45.
- REIDIBOYM-TALLEUX, L.; DIEMER, F.; SOURDIOUX, M.; CHAPELAIN, K.; MARCH, G.G-De. 1999. Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). Effect of maltose and ABA supplements. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55:199-209.
- RIBAS, L.L.F.; GUERRA, M.P.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L. 2000. Somatic embryogenesis in *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg. In: JAIN, S., GUPTA, P. e NEWTON, R. (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Publishers, Netherlands, v. 6, p. 509-537.
- ROBERTS, D.R.; LAZAROFF, W.R.; WEBSTER, F.B. 1991. Interaction between maturation and high relative humidity treatments and their effects on germination of sitka spruce somatic embryos. *Journal of Plant Physiology* 138:1-6.
- RODRIGUES, A.P.M. 1994. *A morphological and histological characterization of the results of auxin type and concentration on induction and development of pecan (Carya illinoensis) somatic embryogenesis*. Athens, Tesis of Doctor in Physiosophy, University of Georgia, 93p.
- ROSS, H.A.; DAVIES, H.V.; BURCH, L.R.; VIOLA, R.; McRAE, D. 1994. Developmental changes in carbohydrate content and sucrose degrading enzymes in tuberising stolons of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum* 90: 748-756.

- SALAJOVA, T.; SALAJ, J.; KORMUTAK, A. 1999. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Am. *Plant Science* 145:33-40.
- SHANNON, J.C. 1968. A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. *Res. Bul.* 842:1-8.
- SCHULLER, A.; REUTHER, G. 1993. Response of *Abies alba* embryonal-suspensor mass to various carbohydrate treatments. *Plant Cell Reports* 12:199-202.
- SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. 1988. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany* 62:43-52.
- SENARATNA, T.; KOTT, L.; BEVERSDORF, W.F.D.; Mc KERSIE, B.D. 1991. Dessication of microspore derived embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Cell Reports* 10:342-344.
- SITA, G.L. 1999. Somatic embryogenesis in Rosewood and other Indian Tree Legumes. In: JAIN, S., GUPTA, P.; NEWTON, R. (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Publishers, Netherlands. v. 5, p.95-111.
- SOARES, M.A. 2000. *Manual de processamento histológico em material animal e vegetal incluídos em historesina plástica - Historesin. Módulo 1.* [s/n] 11p. Apostila. Instituto Butantan. São Paulo.
- SOTAK, R.J.; SOMMER, H.E.; MERKLE, S.A. 1991. Relation of the developmental stage of zygotic embryos of yellow-poplar to their somatic embryogenic potential. *Plant Cell Reports* 10:175-178.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 1998. *Plant Physiology*. 2^a ed., Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts, USA, 792p.
- TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L.C.; DUNSTAN, D.I. 1991. Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal Botany* 69:1873-1899.
- TRICK, H.N.; PUESCHEL, C. 1990. Cytochemical of pit plugs in *Bossiela californica* (Corallinales, Rhodophyta). *Phycologia* 29:403-409.
- TULECKE, W., McGRANAHAN. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. *Plant Science* 40:57-63.
- UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H. 1960. *Method for glucose and others sugars*. In: UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H.; STAUFFER, J.P. (eds.) *Manometric Techniques*. Edition 4, Burguers Publishing Co.
- VIANA, A.M. 1998. Somatic embryogenesis in *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae). In: MANTEL, S.H.; BRUNS, S.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. (eds.) *Recent advances in biotechnology for conservation and management*. Stockholm:International Foundation for Science, p.244-253.

- VIANA, A.M.; MAZZA, M.C.; MANTELL, S. 1999. Plant Conservation Biotechnology: Applications of Biotechnology for the Conservation and Sustainable Exploitation of Plants from Brazilian Rain Forest. In: BENSON, E. (ed.) *Plant Conservation Biotechnology*, University of Abertay, Dundee, UK, p. 277-299.
- VIANA, A.M.; MANTELL, H. 1999. Somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*: an endangered tree of the Mata Atlântica (S. Brazil). In: JAIN, S., GUPTA, P.; NEWTON, R. (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Publishers, Netherlands, v.5, p.3-30.
- VICIENT, C.M.; MARTINEZ, F.X. 1998. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 10 (1):1-12.
- ZIMMERMAN, J.L. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5:1411-1423.
- WATT, M.P.; BLAKEWAY, F.C.; TERMIGNONI, R.; JAIN, S.M. 1999. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunni*. In: JAIN, S., GUPTA, P.; NEWTON, R. (eds.) 1999. *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Publishers, Netherlands, v.5, p.63-78.
- WANN, S.R.; VEAZEY, R.L.; KAPHAMMER, J. 1997. Activated charcoal does not catalyze sucrose hydrolise in tissue culture media during autoclaving. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50:221-224.
- WITJAKSONO; LITZ, R.E.; PLIEGO-ALFARO, F. 1999. Somatic embryogenesis of Avocado (*Persea americana* Mill.). In: JAIN, S., GUPTA, P.; NEWTON, R. (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Publishers, Netherlands, v. 5, p.196-214.
- YEUNG, E.C. 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht:Kluwer Academic, p.205-248.