EFEITO DO CÁLCIO NA INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Eucalyptus urophylla*

SANDRA CRISTINA CAPALDI ARRUDA

Engenheiro Florestal

Orientador: Prof. Dr. **ANTONIO NATAL GONÇALVES**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Ciências Florestais.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 2000

ERRATA

Onde se lê: **M**, substituir por: **mol.L^{-1}**.

Onde se lê: **mM**, substituir por: **mmol.L^{-1}**.

Página 14, segundo parágrafo, quarta linha:

Onde se lê: **estruturas denominadas actina e tubulina**.

Substituir por: **proteínas denominadas actina e tubulina**.

Página 25, sub-ítem *Preparo da curva analítica de calibração e leitura das amostras*, segundo parágrafo, primeira linha:

Onde se lê: **Completou-se o volume para 500 μL com solução de NaCl 0,5 M sendo que o volume final foi completado para 5 mL com a solução de Coomassie.**

Substituir por: **Adicionou-se um volume de 500 μL de solução de NaCl 0,5 M sendo o volume final completado para 5 mL com a solução de Coomassie**.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Arruda, Sandra Cristina Capaldi
Avaliação do efeito do cálcio na indução da embriogênese somática em *Eucalyptus urophylla* / Sandra Cristina Capaldi Arruda. - - Piracicaba, 2000.
73 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia

1. Cálcio 2. Embriogênese somática 3. Eucalipto 4. Indução 5. Morfogênese I. Título

CDD 634.9734

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O Autor"

"Não se pode ensinar tudo a alguém; pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por si mesmo."

(Galileu Galilei)

OFEREÇO...

Aos meus pais, Inês e Sérgio, que me apoiaram em todos os momentos e jamais mediram esforços para concretizar minha formação.

DEDICO...

Ao meu querido esposo Marco, pelas horas de incentivo, paciência, compreensão e carinho.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, amigo onipresente. Sem *Ele* nada seria possível.
- Ao Prof. Dr Antonio Natal Gonçalves pela orientação, pela confiança em mim depositada, pelos seus valiosos conselhos e pela amizade.
- Ao Departamento de Ciências Florestais pelas facilidades oferecidas.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado e pela confiança no projeto.
- Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida (ESALQ-USP) pela dedicada colaboração e amizade.
- Aos Prof. Drs. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno (IQ-UNICAMP) e Sérgio F. Pascholati (ESALQ-USP) pela valiosa colaboração nos experimentos de Fluorescência de Raios-X e Atividade da Peroxidase, respectivamente.

- Aos amigos do **LAFISA** (LCF-ESALQ-USP): Angela Ferrari, Cantídio Gouvêa, Fernando Grossi, Flávia Capaldi, Gustavo Souza, Juliana Fernandes, Lúcia Basso, pela agradável convivência durante estes anos. Em especial, ao Gustavo, por seu valioso auxílio e à Flávia pela colaboração prestada.

- Ao José Roberto Romanini, técnico responsável do LAFISA, pela ajuda prestada e pela agradável convivência.

- A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta dissertação,

Meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS.....ix

LISTA DE TABELAS.....xii

LISTA DE ABREVIATURAS.....xiii

RESUMO.....xiv

SUMMARY.....xvi

1 INTRODUÇÃO.....1

2 OBJETIVO.....3

3 REVISÃO DE LITERATURA.....4

3.1 Embriogênese Somática.....4

3.2 Espectrometria de Raios-X.....9

3.3 Papel do Cálcio na Atividade Celular e Morfogênese.....11

3.4 Eucalyptus e Morfogênese.....17

4 METODOLOGIA.....20

4.1.Desinfestação de sementes, Inoculação e Obtenção dos explantes.....20

4.2 Avaliação dos calos obtidos.....22

4.3 Determinação da concentração de cálcio nos calos através

de Espectrometria de Raios-X.....23

4.4 Quantificação de ProteínasTotais

(Método de Bradford).....24

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....26

4.6.Determinação de carboidratos não-estruturais totais

(Método da Antrona).....27

4.7 Determinação da atividade específica da peroxidase.....29

4.8 Histologia.....30

4.9 Análise dos dados.....31

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....33

5.1 Indução de calos.....33

5.2 Determinação analítica do Cálcio.....36

5.3 Quantificação de Proteínas Totais.....39

5.4 Determinação de carboidratos não-estruturais

totais.....41

5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas totais.....43

5.6 Atividade específica da peroxidase.....44

5.7 Avaliação Morfológica e Histológica.....48

5.8 Análise de Componentes Principais (PCA).....55

6 CONCLUSÕES.....58

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....60

LISTA DE FIGURAS

Página

1 Variação na massa fresca dos calos em N7 + 5,0 mg.L^{-1} de Picloram aos 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo em relação ao hipocótilo recém inoculado.....34

2 Indução de calos de *E. urophylla* no meio de cultura N7+5,0 mg.L^{-1} de Picloram nas diferentes semanas avaliadas.....35

3 Calo de *E. urophylla* aos 20 dias de cultivo em meio de cultura N7+5,0 mg.L^{-1} de Picloram, apresentando enrugamento superfcial e coloração verde amarelada.....36

4 Contéudo de cálcio determinado por fluorescência de raios-X nas amostras de calos de *Eucalyptus urophylla* após 20 dias de cultivo no meio de cultura descrito por Simola (1985), e suplementado com diferentes concentrações de cálcio.....37

5 Curva analítica de calibração para albumina.....39

6 Conteúdo de proteínas totais determinado pelo Método Bradford em amostras de calos de *E. urophylla* após 20 dias de cultivo em meio de cultura descrito por Simola (1985) e suplementado com diferentes concentrações de cálcio.....40

7 Curva analítica de calibração para glicose.....41

8 Conteúdo de açúcares totais em amostras de calos de *E. urophylla* após 20 dias de cultivo em meio de cultura descrito por Simola (1985) suplementado com diferentes concentrações de cálcio.....42

9 Aspectos das bandas protéicas observadas nos calos de *E.urophylla* cultivados em meio de cultura N7 com diferentes doses de cálcio aos 20 dias de cultivo nos tratamentos avaliados.....44

10 Atividade específica da peroxidase em amostras de calos de *E. urophylla* após 20 dias de cultivo em meio de cultura descritos por Simola (1985) e suplementado com diferentes concentrações de cálcio.....45

11 Aspectos morfológicos dos calos de *E. urophylla* aos 20 dias de

cultivo em N7 com diferentes concentrações de cálcio.....52

12 Aspectos histológicos dos calos de *E. urophylla* aos 20 dias de cultivo em N7 com diferentes concentrações de cálcio.....53

13 Análise histológica de embriões somáticos e células embriogênicas obtidos de calos de E. urophylla aos 20 dias de cultivo em N7 com diferentes concentrações de cálcio.....54

14 Análise de Componentes Principais (PCA) para as variáveis proteína, açúcares, peroxidase e cálcio, aos 20 dias de cultivo em meio de cultura N7 suplementado com diferentes concentrações de cálcio.....56

LISTA DE TABELAS

Página

1 Composição do meio de cultura N7 descrito por Simola (1985).....21

2 Tratamentos empregados e doses de cálcio sob a forma de $CaCl_2.2H_2O$.....22

3 Composição dos mini-géis utilizado na eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas totais.....27

4 Análise dos calos induzidos a partir de hipocótilos de *E. urophylla* cultivados em N7 + 5,0 $mg.L^{-1}$ de Picloram aos 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo.....35

5 Porcentagem de cálcio absorvida pelos calos de *E. urophylla* nos diferentes tratamentos.....38

LISTA DE ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amônio
Bar	Barra
BSA	Bovine Serum Albumine (Albumina bovina)
DMSO	Dimetil-sulfóxido
g	Gravidade
N7	Meio de cultura descrito em Simola (1985)
PCA	Análise de Componentes Principais
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiconílico
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
TEMED	Tetrametiletilenodiamina

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CÁLCIO NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Eucalyptus urophylla*

Autora: SANDRA CRISTINA CAPALDI ARRUDA

Orientador: Prof. ANTONIO NATAL GONÇALVES

RESUMO

O objetivo dessa dissertação foi avaliar os efeitos do cálcio na indução de morfogênese, mais especificamente na embriogênese somática de *Eucalyptus urophylla* a partir de hipocótilos cultivados "in vitro". Análises bioquímicas e histológicas foram realizadas visando observar o papel do cálcio nos conteúdos de proteínas e açúcares totais, na atividade específica da peroxidase e na morfogênese, a qual foi avaliada mediante técnicas de histologia. As concentrações de cálcio (na forma de $CaCl_2.2H_2O$) variaram de 0 a 12,12 mM e foram adicionadas ao meio de cultura descrito por Simola (1985) sendo que a concentração de cálcio presente nos calos foi determinada diretamente por Espectrometria

de Fluorescência de Raios-X, um método não-destrutivo que permitu que as mesmas amostras quantificadas fossem utilizadas nas análises histológicas. Uma análise estatística multivariada (Análise de Componentes Principais - PCA) permitiu agrupar os tratamentos em 5 blocos e indicou o grupo mais responsivo para uma resposta morfogênicas considerando as interações entre todos os parâmetros avaliados. Em baixas concentrações de cálcio veirificou-se ausência de resposta morfogênica e a histologia revelou tecidos colapsados e dessaranjados. Aumentando a concentração do cátion, os teores de proteínas e açúcares totais e a atividade específica da peroxidase também aumentaram. Ao nível histológico foram verificadas diferenças entre os tratamentos e foi possível verificar que a concentração de cálcio de 6,62 $mmol.L^{-1}$, estimulou a formação de embriões somáticos globulares.

EVALUATION OF THE CALCIUM EFFECT IN THE *Eucalyptus urophylla* SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCTION

Author: SANDRA CRISTINA CAPALDI ARRUDA

Adviser: Prof. ANTONIO NATAL GONÇALVES

SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the calcium effects in the morphogenesis induction, speciffically in the somatic embryogenesis of *Eucalyptus urophylla* hipocotils. Biochemical and histological analysis were performed in order to observe the calcium role in the total protein and sugar contents, in the peroxidase specific activity and in the morphogenesis, wich was evalueted by histology. The calcium ($CaCl_2.2H_2O$) concentrations from 0.0 to 12.12 mM were added to Simola (1985) culture medium and calcium concentration in calli was determined directly by X-Ray Flourescence Spectrometry, a non-destructive technique, allowing for the processing of the same tissue for histological analysis. A

multivariate analysis (PCA-Principal Components Analysis) grouped the treatments into 5 clusters and indicated the more responsive group for a morphogenic response considering the interactions between the evaluated parameters and the calcium concentration. Lack of calcium supply caused a complete absence of a morphogenic process and tissue collapsing. The increase in calcium concentration favored the presence of higher total protein and sugar contents, the increase of peroxidase specific activity and changes in the histological characteristics. It was possible to verify that calcium stimulated globular somatic embryo formation at concentration of 6.62 $mmol.L^{-1}$.

Capítulo 1. INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos é uma ferramenta extremamente versátil na propagação de plantas; esta versatilidade está associada aos diferentes resultados obtidos em função do tipo de material propagado e da técnica utilizada para a cultura. Como exemplo dessa versatilidade pode-se citar: utilização de ápices e meristemas, que é requerida quando se deseja a micropropagação propriamente dita da planta ou sua clonagem; outro caminho é a regeneração da planta via organogênese ou embriogênese somática partindo-se de uma célula ou tecido ou ainda através da cultura de protoplastos, esta última muito utilizada na Engenharia Genética; por outro lado, se o objetivo é a produção de metabólitos químicos visando atender à demanda de indústrias farmacêuticas, pode-se lançar mão do cultivo de células em suspensão.

Para que estas etapas descritas tornem-se realidade, faz-se necessário conhecer os processos de indução, diferenciação e competência celular, bem como que entender como se dá o crescimento dos tecidos e das células em cultura, para que uma vez compreendidos, possam ser aplicados eficazmente.

Neste sentido, a diferenciação celular pode ser entendida como a especialização de diferentes regiões da planta com a finalidade de desempenhar uma função específica, sendo provavelmente o aspecto mais importante da cultura de tecidos, uma vez que é um processo vital

para se chegar à regeneração da planta, seja mediante organogênese ou embriogênese somática.

Portanto, para entender a diferenciação celular torna-se necessário avaliar e conhecer os mecanismos pelos quais as diferentes regiões de uma planta ou tecido tornam-se especializadas e como regulam o funcionamento integrado da planta. De acordo com Evans et al. (1983), os organismos biológicos percebem os sinais químicos e ambientais através de receptores ou de mecanismos da membrana celular; estes organismos quando estimulados, são capazes de expressar uma resposta morfogênica específica, levando à conclusão que a aplicação de um estímulo (ou de uma mistura de estímulos) seja ele químico, elétrico, físico, entre outros, é um evento favorável dentro do processo de diferenciação de células somáticas em células embriogênicas.

Esta dissertação foi inserida dentro deste contexto, e a escolha do cálcio como agente indutor de morfogênese foi baseada na formulação de algumas hipóteses, como por exemplo: a) O cálcio está relacionado com eventos morfogenéticos vegetaisporque é indutor do estabelecimento da polaridade celular, a qual é considerada por diversos autores, como a primeira etapa no estabelecimento da embriogênese; b) Uma das principais funções do cálcio é atuar na formação de parede celular e nos processos de divisão celular e, c) O cálcio atua como um dos principais agentes no processo de tradução de sinais endógenos.

Estas hipóteses foram levantadas mediante afirmações extraídas de literatura referente ao assunto e constituíram as principais bases dos objetivos propostos e da metodologia desenvolvida.

Capítulo 2. OBJETIVO

Com base nas hipóteses estabelecidas, o objetivo geral desta dissertação foi avaliar o efeito do cálcio como promotor da morfogênese, visando a indução de embriogênese somática.

Os objetivos específicos consistiram na avaliação de diferentes parâmetros bioquímicos (teor de açúcares e proteínas totais e atividade específica da peroxidase), considerados na literatura como indicadores do processo de embriogênese somática, e as suas relações com as concentrações de cálcio absorvidas pelos calos. O acompanhamento histológico da morfogênese através de microscopia óptica, nas diversas concentrações de cálcio empregadas, também fez parte dos objetivos específicos desta dissertação.

Capítulo 3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Embriogênese somática

A embriogênese somática é o processo pelo qual as células haplóides ou diplóides desenvolvem-se em plantas diferenciadas através de estágios embriológicos característicos, sem a fusão dos gametas. O embrião somático, que é morfológica e fisiologicamente similar ao embrião zigótico, tem o aspecto bipolar e apresenta sistema vascular fechado (Schumann et al., 1995; Williams e Maheswaran, 1986).

A maioria dos autores acreditam que, apesar da origem ser desconhecida, células pequenas com citoplasma denso e com rápida divisão, são as primeiras unidades de desenvolvimento do embrião somático, que é sempre precedido pela formação de um pequeno grupo de células (Ronchi e Giorgetti, 1995).

A embriogênese somática é melhor conhecida como uma via de regeneração induzida pela cultura de tecidos "in vitro", ocorrendo indiretamente a partir de calos, através de suspensão celular ou cultura de protoplastos, ou ainda, diretamente a partir de células de tecidos com estrutura organizada, como por exemplo, segmentos de pecíolo ou do embrião zigótico (Williams e Maheswaran, 1986). O embrião somático é freqüentemente chamado de embrióide (Schumann et al., 1995).

Desde 1958, quando o primeiro embrião foi obtido a partir de tecidos somáticos de cenoura (*Daucus carota*) cultivados 'in vitro', observou-se um número crescente de espécies e tecidos que têm sido

utilizados com objetivo de induzir embriões somáticos. Devido a isso, nota-se uma tendência contínua de estudos que visem obter maior conhecimento sobre o processo e maior habilidade de exploração. Sabe-se que, apesar dos embriões somáticos serem originados a partir de células somáticas, estes assemelham-se muito aos zigóticos, presumindo-se que possam resultar da expressão gênica que regula a mesma via de desenvolvimento (Parrott et al., 1991).

Ainda de acordo com Parrott et al. (1991), uma variedade de tipos de tecidos vegetais têm sido utilizada como fonte de explantes, do qual obtêm-se os embriões somáticos. Como exemplo, o autor cita os tecidos derivados do embrião imaturo, os quais são especialmente susceptíveis à indução embriogênica. Entretanto, a utilização do embrião zigótico como fonte de explante é normalmente uma limitação para o caso de espécies de polinização cruzada, nas quais o embrião zigótico represente um genótipo desconhecido.

Em consideração à existência de um estado embriogênico celular anterior à formação do embrião somático, foi proposto o termo "célula embriogênica pré-determinada" (PEDC), (Sharp et al., 1980). Sugere-se que a embriogênese direta em cultura é precedida por estas células, requerendo somente reguladores de crescimento ou condições favoráveis para o início da divisão celular para a posterior expressão da embriogênese (Williams e Maheswaran, 1986). Por outro lado, o termo "célula com determinação embriogênica induzida" (IEDC) é usado para identificar células que adquiriram o potencial embriogênico durante o período de cultivo (Sharp et al., 1980). Neste caso, as várias gerações celulares que se sucedem entre o explante original e a formação do embrião somático, são manifestadas como calos e a embriogênese

somática é dita indireta. Logo, a embriogênese indireta requer a predeterminação das células diferenciadas, a proliferação dos calos e o desenvolvimento do estado embriogenicamente determinado (Williams e Maheswaran, 1986). De acordo com Parrott et al. (1991), as IEDC e as PEDC são funcionalmente equivalentes e, portanto, o termo "célula embriogênica" (EC) pode ser adotado. Esta teoria é uma extensão das primeiras conclusões segundo as quais, o estado interno das células do explante é o fator primordial na expressão da embriogênese somática; as outras condições, tais como os reguladores de crescimento exógenos, aparecem como elementos que iriam permitir uma expressão deste padrão intrinsecamente determinado do desenvolvimento (Williams e Maheswaran, 1986).

Todos os sistemas de células embriogênicas do qual os embrióides são visivelmente derivados apresentam aspectos comuns, sendo caracterizados pelas células meristemáticas em intenso processo de divisão. As características das células incluem: tamanho reduzido das células, citoplasma denso, núcleo grande com nucléolo avantajado e proeminente, pequenos vacúolos e uma profusão de grãos de amido. Suas propriedades histoquímicas e ultra-estruturais sugerem uma intensa síntese de RNA e atividade metabólica (Williams e Maheswaran, 1986).

Uma vez que as ECs foram obtidas, a presença contínua de uma auxina pode ser inibidora do desenvolvimento normal do embrião somático. Se a concentração de auxina for considerada excessivamente alta, ao invés do procedimento do próximo estágio de sua ontogenia, o embrião somático pode originar novos embriões somáticos. Este fato pode ser denominado como embriogenia secundária, recorrente ou repetitiva. Dependendo das espécies e do sistema de cultura, um ciclo

repetitivo pode ser expresso como uma propagação contínua de vários estágios embriogênicos, incluindo massas proembriônicas, embriões globulares ou até mesmo embrião no estágio cotiledonar (Parrott, et al, 1991).

Existe uma dificuldade em se identificar um número de acontecimentos comuns associados com a diversidade de observações da embriogênese somática 'in vitro'. Há uma estreita homologia entre a embriogênese somática direta e indireta e entre a célula isolada e a iniciação multicelular do embrióide. Muitas diferenças observadas podem ser atribuídas às diferenças nas relações entre as células circunvizinhas das células iniciais e o que as células requerem para sua redeterminação ao estágio embriogênico. Calos nodulares embriogênicos consistem de pró-embriões proliferando-se, onde as respostas coordenadas em cada grupo globular de células são essencialmente similares às observações do estado embriogênico direto associado com a suspensão do eixo embrionário (Ronchi e Giorgetti, 1995).

A regeneração de plantas pela via indireta é muito comum. Estudos morfológicos e histológicos detalhados, feitos por Schumann et al. (1995), foram capazes de caracterizar 3 tipos de tecidos de calo com variação na cor, estrutura e resposta morfogenética: a) calos compactos (globulares ou nodulares), amarelos e densos, consistindo-se de pequenas células isodiamétricas; b) calos irregulares, soltos, consistindo de células arranjadas sem coesão, aparentemente mais semitransparentes que os anteriores, com regiões densas e pouco coloridas e, c) tecidos de calos irregulares, pouco coesos, com células alongadas, tubulares, grandes, translúcidas e não morfogênicas. Os autores observaram que o desenvolvimento de células semelhantes às do

procâmbio foram observadas apenas no primeiro tipo de calo, durante o período que coincidiu com a fase de proliferação celular, indicando este tipo particular de calo como favorável para obtenção da morfogênese.

Para diferentes espécies, a indução de embriogênese somática tem sido correlacionada com determinadas necessidades nutricionais (Thorpe, 1983); entretanto, poucos estudos têm sido dirigidos a este tema, ou seja, à análise do consumo dos componentes nutricionais (Dussert et al., 1995), o que poderia levar a uma otimização do meio de cultura e, como conseqüência, a um melhor controle dos eventos embriogênicos (Magnaval et al., 1997). Neste sentido, os autores observaram uma relação positiva (R^2 = 0,88) entre o conteúdo endógeno de glicose e frutose e os conteúdos de cálcio, magnésio, potássio, amônio e cloreto em calos embriogênicos de *Cocos nucifera*.

Outras variáveis também são relacionadas ao estado embriogênico de calos. Blanco et al. (1997), trabalhando com cana-de-açúcar verificaram a presença de uma proteína entre 55 e 70 kDa que poderia estar relacionada com a habilidade de regeneração de calos embriogênicos, funcionando como uma espécie de marcador para a cultivar estudada. Kikuchi et al. (1995), analisaram polissacarídeos pépticos e compararam entre calos embriogênicos e não-embriogênicos de cenoura, concluindo que os calos embriogênicos formaram um maior número de grupamentos celulares, e que o nível de açúcares neutros foi superior em relação aos calos não-embriogênicos. Através de cromatografia gasosa puderam verificar que os calos embriogênicos, bem como os embriões somáticos, apresentavam maiores teores de arabinose, enquanto que os calos não-embriogênicos eram ricos em galactose.

Yeo et al. (1998), analisaram as alterações quantitativas e qualitativas dos polissacarídeos na parede celular durante a embriogênese somática e o desenvolvimento de plântulas de aspargo (*Asparagus officinalis* L,) concluindo que arabinose foi mais ativamente sintetizada em calos embriogênicos sendo posteriormente degradada durante o curso da diferenciação. De acordo com Stacey et al. (1990), paredes celulares associadas a proteínas arabinogalactanas (AGPs) ocorrem em muitos tecidos vegetais, mas seu tipo varia com o tecido. Trabalhando com cenoura, após a cultura tornar-se embriogênica, os autores puderam verificar picos de AGPs semelhantes ao modelo de AGP encontrado em sementes. Pennell et al. (1992), sugerem que o aparecimento de AGPs marca a transição no momento de formação das células embriogênicas.

De acordo com de De Vries et al. (1988), análises revelaram que um grande número de proteínas extracelulares são excretadas pelas células embriogênicas para o meio de cultura, e que elas podem atuar como marcadores moleculares para distinguir culturas embriogênicas e não-embriogênicas; os autores sugerem que algumas destas proteínas apresentam também um importante papel na indução e no desenvolvimento de embriões somáticos.

3.2. Espectrometria de Raios - X

De acordo com Leyden (1992), a espectrometria de raios-X é um método espectroscópico de emissão utilizado para determinação quali e quantitativa de macro e microelementos em uma variada gama de tipos de amostras. O princípio da técnica consiste em que o elemento em questão emite raios-X quando excitado por radiações-X através de

irradiações. Os raios-X emitidos pelo elemento são então observados por um detetor sólido que analisa a energia dos fótons de raios-X, produzindo uma distribuição espectral na forma de um gráfico que tem como abcissa a intensidade (keV) e como ordenada, a energia. Uma vez plotado o espectro, computadores baseados nas análises multicanais, produzem os resultados da determinação analítica requisitada, convertendo intensidade em concentração e mediante técnica de parâmetros fundamentais, obtém-se os valores definitivos em unidades de ppm ou %.

Para Leyden (1992), o método é aplicado para determinação de elementos com número atômico igual ou superior a 11 (= Na), sendo ideal para amostras sólidas mais finas; entretanto, amostras mais espessas ou mesmo líquidas podem ser analisadas, também com bons resultados. Neste sentido, Skoog et al. (1998), comentam que Ca, Ba e Zn têm sido determinados em óleos lubrificantes através de excitação via fluorescência de amostras líquidas. Também é um método indicado para determinação direta de pigmentos em amostras de tecidos.

As principais vantagens da fluorescência de raios-X de acordo com Skoog et al. (1998) são: obtenção relativamente simples dos espectros; metodologia não destrutiva podendo ser usada para análises de pigmentos, pinturas, espécimes arqueológicos, amostras de plantas, amostras de solo e rochas, entre outras. Outra vantagem citada pelos autores, é a velocidade e a praticidade das quantificações, pois é possível realizar uma análise multielementar em poucos minutos. Há que salientar que a precisão e exatidão da fluorescência de raios-X é freqüentemente igual ou superior aos outros métodos.

Na análise de plantas, muitos trabalhos envolvendo a aplicação de fluorescência de raios-X têm sido publicados, citando dentre

eles Omote et al. (1995), que trabalharam com fluorescência de raios-X utilizando o método de parâmetros fundamentais para a determinação da composição elementar de amostras de plantas; os autores concluíram que a utilização desta metodologia foi eficiente para aumentar a performance da análise quantitativa diminuindo a número de amostras padrão ou materiais de referência.

Fukumoto et al. (1992), utilizaram a técnica de fluorescência de raios-X como técnica não destrutiva para verificar flutuações nos teores de K, Ca, Mn, Fe e P em plantas danificadas por chuva ácida e por altas doses de radiação X.

Frank et al. (1992), determinaram, através de fluorescência de raios-X, as concentrações totais de metais pesados e de outros elementos (K, Ca, Ti, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Br, Sr e Pb) em algas, visando determinar as acumulações diferenciais destes elementos ao longo das diferentes estruturas da alga (base, estipe, estruturas reprodutivas e zonas meristemáticas). Os pré-tratamentos químicos das amostras não foram necessários, o que minimizou as possibilidades de contaminação.

Miah et al. (1999), utilizaram a técnica de fluorescência de raios-X para obter diagnose rápida para K, Ca e Cl em amostras foliares de cevada, concluindo que esta técnica pode ser um método fácil, rápido e prático para diagnosticar os teores dos nutrientes nos tecidos de plantas e também para auxiliar nos processos de crescimento e desenvolvimento através do monitoramento dos teores nutricionais.

3.3. Papel do Cálcio na Atividade Celular e Morfogênese

O cálcio está localizado no apoplasto em forma trocável na parede celular e na superfície externa da membrana plasmática. Sua mobilidade é considerada muito baixa tanto ao nível celular como no interior do floema. São considerados mediadores de muitas reações químicas e/ou bioquímicas, relacionando-se com os mecanismos envolvidos nos processos de crescimento e desenvolvimento da planta (Marschner, 1986). As concentrações de cálcio em tecidos sadios de plantas variam entre 0,2 a 5,0 % na matéria seca, sendo muito provável que tais valores excedam as exigências metabólicas mínimas. Plantas crescendo em solução nutritiva com alto teor de cálcio normalmente apresentam concentrações mais elevadas do cátion em relação àquelas cultivadas de forma tradicional (Malavolta, 1980).

Em relação ao acúmulo de cálcio pela célula, Marmé (1988) comenta que este cátion pode ser acumulado no cloroplasto e também nas mitocôndrias; o acúmulo na mitocôndria favorece o transporte do cálcio intracelular e seu controle dentro do citoplasma. Outros sítios de acúmulo de cálcio são: parede celular, membranas celulares e vacúolos. Nas plantas, o cálcio é um dos principais mensageiros dentro do sistema de transmissão de estímulos externos (Penel e Greppin, 1979). Graças a sua alta afinidade com a calmodulina, ou com outras proteínas que se liguem a ele, o cálcio atua de forma direta sob muitos processos fisiológicos ao nível celular (Pietrobon et al. (1990); Grover (1998)).

Poovaiah e Reddy (1987), comentam que devido à semelhança de raio iônico, outros cátions poderiam substituir os sítios de ligação do cálcio, mas eles não estariam capacitados para substituir o cálcio em uma de suas principais funções, ou seja, a de estabilizador da membrana. Eklund e Eliasson (1990), trabalharam com hipocótilos de

Pinus e observaram que a falta de cálcio (ou sua ausência) reduziu a síntese de parede celular, evidenciando o papel deste cátion na manutenção da estrutura celular.

Dado que o crescimento vegetal depende do cálcio e os processos de divisão e alongamento celulares são afetados pela concentração do íon (Hepler e Wayne, 1985), a deficiência de cálcio deverá resultar em uma inibição de crescimento e levar ao desenvolvimento de desordens fisiológicas, já que a concentração de cálcio citossólico livre regula diversos eventos intracelulares, como o crescimento, desenvolvimento, metabolismo e outras funções mediadas por fitoreguladores.

Durante a ativação celular, verifica-se um aumento de quatro a cinco vezes na permeabilidade da membrana plasmática em relação ao cálcio (Borle, 1981). O autor verificou também que qualquer tipo de injúria à membrana plasmática pode conduzir a um aumento significativo da entrada de cálcio no citoplasma e, neste caso, a mitocôndria serviria como um reservatório intracelular que seqüestraria temporariamente o cálcio em excesso (Akerman e Nicholls, 1983), quando a capacidade mitocondrial é excedida, as concentrações excessivas de cálcio podem exercer efeitos tóxicos.

De acordo com Hepler e Wayne (1985), um número crescente de processos que ocorrem em plantas e que são mediados pelo cálcio vêm sendo estudados e descobertos; dentre eles os autores destacam três processos celulares, ou seja, o crescimento polarizado, a mitose e os fluxos ou correntes citoplasmáticos.

Quanto ao papel do cálcio no crescimento polarizado, Robinson e Jaffe (1975), trabalhando com *Pelvetia*, comentam que o polo

do rizóide de zigotos absorvem o cálcio mais rapidamente do que o polo do talo. Observaram ainda que a concentração intracelular de cálcio torna-se elevada na zona de crescimento, possivelmente como resultado de um influxo localizado. Portanto, células que exibem um crescimento polarizado apresentam gradientes de cálcio. Hause et al. (1994), observaram que o cálcio estava acumulado na protoderme de embriões globulares e no cilindro central de embriões em estágio de torpedo quando avaliaram a expressão da polaridade nestes estágios da embriogênese somática; a avaliação deu-se através da detecção da distribuição da calmadulina ativada, do teor de cálcio e pela detecção de amido.

A importância do estabelecimento da polaridade é que ela é um dos principais fatores envolvidos na diferenciação inicial do embrião (Cutter, 1986). Neste sentido, Fosket (1994), afirma que o cálcio, através da formação de um gradiente de concentração, aparece como um do principais responsáveis tanto no estabelecimento da polaridade celular como na organização do citoesqueleto.

Ainda em relação ao processo de polarização celular, fator estritamente relacionado à embriogênese somática, Medvedev e Markova (1998), comentam que a habilidade de resposta a um estímulo externo, é uma propriedade do citoesqueleto celular, principalmente das estruturas denominadas actina e tubulina. Entretanto, de acordo com Williamson (1984), os íons cálcio apresentam uma participação significativa na regulação do funcionamento do citoesqueleto.

Em plantas, segundo trabalhos de Feijo et al. (1995), e de Malho e Trewavas (1996), o cálcio está diretamente envolvido nas funções do citoesqueleto nos seguintes processos: movimentos

flagelares, divisão celular, cicloses e crescimento polarizado (abrangendo crescimento apical e extensões celulares). Outra função atribuída ao cálcio de acordo com Marmé (1988), é a fosforilação de proteínas em plantas a qual, segundo o autor, deve ser regulada por concentrações fisiológicas de cálcio, sendo que parte desta regulação, estaria mediada pela calmadulina.

Trewavas e Gilroy (1991) verificaram que o cálcio mantinha os teores de proteínas e de RNA em níveis considerados adequados, e que sua ausência resultou em aumento da degradação de proteínas bem como diminuição do crescimento, sugerindo a existência de uma relação entre a redução de crescimento e a estabilidade de proteínas. Neste sentido, Xu e van Huystee (1993), verificaram que ao adicionar substâncias quelantes do cálcio ao meio de cultura de amendoim, o teor de proteínas diminuiu.

Alguns autores têm avaliado o papel do cálcio na embriogênese somática. Nomura e Komamine (1985) trabalharam com o modelo de embriogênese para cenoura; Timmers et al. (1996), demonstraram que a polarização do cálcio citosólico livre ocorre durante a polarização morfológica dos agrupamentos de células embriogênicas; Jansen et al. (1990), verificaram que em suspensões celulares de cenoura, um aumento na concentração de cloreto de cálcio durante o tratamento de indução de embriogênese, duplicava a produção de embriões somáticos; Verdus et al. (1993), observaram que em folhas de *Cichorium* o acúmulo de cálcio no vacúolo e sua excreção extracelular aliados ao espessamento da parede celular, foram os principais processos detectados durante os estágios iniciais da embriogênese somática.

Dussert et al. (1995), trabalhando com calos embriogênicos de *Cocus nucifera*, verificaram que para os dois tipos de origem de embriogênese obtidos, (unicelular e pluricelular), foram requeridas altas doses de NH_4^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} e de sacarose.

Etienne et al. (1997), verificaram o papel do cálcio na proliferação e regeneração de embriões somáticos de *Hevea brasiliensis*, concluindo que altas concentrações deste cátion favorece ao processo de embriogênese e promove a manutenção do estágio embriogênico em calos mantidos por longos períodos em cultura, principalmente para espécies consideradas como recalcitrantes em relação a embriogênese.

Cho-UnHaing et al. (1995), verificaram que a inclusão de cálcio na forma de $CaCl_2$ (1mmol.L $^{-1}$) ao meio de cultura, aumentou a produção de embrióides em cevada e trigo. Os autores sugerem a existência de uma ação positiva do cálcio livre na produção de embrióides. Montoro et al. (1993) utilizando meio de cultura para *Hevea brasiliensis*, obtiveram calos friáveis e embriogênicos e que a friabilidade do calo foi realçada quando as concentrações do fitoregulador 3,4D foram reduzidas de 4,5 para 0,45 μM ou quando altos níveis de sacarose ou cálcio (351 e 12 mmol.L $^{-1}$ respectivamente) foram mantidos durante a cultura. Observaram também que os calos friáveis mantidos pela alteração tradicional do balanço entre auxina/citocinina perderam seu potencial embriogênico, enquanto que os mantidos em altas doses de sacarose e cálcio eram compostos principalmente por células embriogênicas.

Utilizando a técnica de microanálises por raios-X (EPMA), Pedroso et al. (1995) observaram flutuações severas no número de cristais de oxalato de cálcio e no acúmulo de amido, os quais ocorriam

após o período de indução de embriogênese e apenas nos explantes. Verificaram também que as mudanças na composição da parede celular de células competentes ocorreram rapidamente após o tratamento de indução. Após a indução da embriogênese somática detectaram-se flutuações significativas nas concentrações de cálcio, potássio, sódio, ferro, enxofre e magnésio, sendo que o sucesso da morfogênese foi dependente da disponibilidade de cálcio.

3.4. *Eucalyptus* e morfogênese

A utilização da embriogênese somática em combinação com técnicas da criopreservação e de Engenharia Genética pode aportar um novo contexto ou significado para a produção massal de plantas de interesse comercial, bem como para os programas de conservação *ex situ* (Luukkanen et al., 1998). Entretanto, de forma geral, ainda são escassos os trabalhos envolvendo embriogênese somática nas espécies de *Eucalyptus*.

Dentro desta abordagem, Bandyopadhyay et al. (1999), utilizando calos cotiledonares e hipocotiledonares de *Eucalyptus nitens* e *E. globulus* obtiveram regeneração de plantas via organogênese, em freqüências de 30-35 % para calos derivados de hipocótilo e 20-25 % para derivados de cotilédone; estruturas semelhantes a embriões somáticos foram observados ocasionalmente em *E. nitens* e em menor proporção em *E. globulus*.

Utilizando explantes de "seedlings" de *E. nitens* com 3 semanas, cultivados inicialmente em meio MS, contendo 20 μM de auxina e transferidos para meio de cultura contendo combinações de ANA (0,1-0,5 μM) e BAP (0-0,5 μM), Ruaud et al. (1997), obtiveram embriões

somáticos, sendo que a melhor condição para o aparecimento dos embriões o cultivo dos calos provenientes de hipocótilo, na presença de 0,1 μM de BAP.

Termignoni et al. (1996), obtiveram indução de embriogênese somática a partir de "seedlings" de 3 dias cultivados ou na presença de ANA (5,5 ou 16,5 μM) ou em combinação com 4,5 μM de 2,4-D; posteriormente os embriões foram transferidos para meio de cultura isento de auxina e os autores observaram que tanto a suplementação com 10 % de leite de coco como a adição de 1 $g.L^{-1}$ de caseína hidrolizada induziram o desenvolvimento dos embriões somáticos.

Segmentos internodais foram utilizados por Gill e Gill (1994), visando a indução de embriões somáticos; estes segmentos foram cutivados em MS suplementado com várias concentrações e combinações de reguladores de crescimento, sendo que o melhor resultado obtido foi a produção de agregados celulares embriogênicos no meio de cultura suplementado com a dose de 1 $mg.L^{-1}$ de benziladenina. Segundo os autores, os agregados celulares embriogênicos desenvolveram-se em embriões somáticos, os quais produziram gemas mas não produziram raízes.

Em *Eucalyptus citriodora,* a produção de embriogênese somática foi estudada por Muralidharan et al. (1989); os autores obtiveram uma cultura altamente embriogênica a partir de embriogênese repetitiva de embriões somáticos cultivados no escuro em meio contendo glutamina e caseína hidrolizada (500 $mg.L^{-1}$ de cada uma), 30 $g.L^{-1}$ de sacarose e 5 $mg.L^{-1}$ de ANA. Após transferência para meio de cultura isento de hormônios e na presença de luz, 50 % dos embriões

desenvolveram-se em plântulas e, destes, 70 % sobreviveram após transferência para uma mistura de solo e areia.

Boulay (1987) realizou estudos preliminares de morfogênese em *Eucalyptus dunni* utilizando folhas, internós, gemas terminais, hipocótilos e cotilédones obtidos de "seedlings" com 4-8 pares de folhas; os explantes foram inoculados em MS contendo auxinas e/ou citocininas. Foi observado que todos os explantes (exceto os cotilédones) mostravam-se organogênicos e que os hipocótilos e os segmentos foliares produziram gemas adventícias quando cultivados em meio contendo apenas BAP. Desenvolvimento de organogênese também foi verificado a partir de calos hipocotiledonares de *E. urophylla* cultivados em MS suplementado com 0,1-0,5 mg $.L^{-1}$ de ANA e 0,1-1,0 mg $.L^{-1}$ de BAP ou 0,05-2,0 mg $.L^{-1}$ de ANA e 0,01-2,0 mg $.L^{-1}$ de TDZ. A maior porcentagem de regeneração via organogênese (37,5 %) deu-se em presença de 0,2 $mg.L^{-1}$ de ANA e BAP (Tibok et al., 1995).

Devido à importância do tema, à escassez de trabalhos referentes à embriogênese somática em *Eucalyptus*, às hipóteses levantadas e ao papel do cálcio no processo morfogênico, foram estabelecidos os objetivos desta dissertação e propostos vários experimentos, os quais serão descritos, a continuação, no capítulo 3.

Capítulo 4. METODOLOGIA

4.1. Desinfestação de sementes, Inoculação e Obtenção dos Explantes

Foram utilizadas sementes de *Eucalyptus urophylla* fornecidas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) catalogadas como T8A32, lote AN416 e coletadas em população base plantada em Anhembi, SP.

As sementes inicialmente foram lavadas em água corrente e detergente, sendo posteriormente imersas em álcool etílico absoluto durante 3 segundos. Após imersão em álcool, foram transferidas para solução de hipoclorito de sódio comercial 70 % (V/V) contendo 2 gotas de Tween 20, onde permaneceram durante 20 minutos sob agitação.

Em seguida, as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar, lavadas 3 vezes com água esterilizada e transferidas para frascos esterilizados contendo papel de filtro embebido em água deionizada. Em cada frasco, foram adicionadas, em média, 30 sementes. Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, intensidade luminosa de 3000 Lux e temperatura de 26° ± 2° C. A germinação iniciou-se aos 4 dias da inoculação e os hipocótilos, os

quais foram considerados explantes definitivos, foram coletados aos 12 dias, desprezando-se as raízes e a inserção dos cotilédones.

Para a indução de calos, utilizou-se o meio de cultura N7 (Simola, 1985; Tabela 1), suplementado com 5 $mg.L^{-1}$ de Picloram e 1,0 $mg.L^{-1}$ de caseína hidrolizada. Os calos induzidos foram coletados e transferidos para meio de cultura N7, contendo diferentes doses de cálcio, permanecendo em cultivo durante 20 dias. As concentrações de Ca^{2+} (na forma de $CaCl_2.2H_2O$) empregadas, constituíram cada uma um tratamento, conforme mostra a Tabela 2. Em cada tratamento foram utilizadas 3 placas contendo cada uma, 12 calos, totalizando 36 calos por tratamento.

Tabela 1. Composição do meio de cultura N7 descrito por Simola (1985).

Macronutrientes	$mg.L^{-1}$	Aditivos	$mg.L^{-1}$
$(NH_4)_2SO_4$	463,0	Ácido Nicotínico	0,5
KNO_3	2830,0	Tiamina HCl	0,1
$MgSO_4.7H_2O$	185,0	Piridoxina HCl	0,5
KH_2PO_4	399,5	Glicina	2,0
$CaCl_2.2H_2O$ [1]	-	Meso-Inositol	100,0
Micronutrientes	**$mg.L^{-1}$**	**Outros**	**($g.L^{-1}$)**
EDTA Férrico	37,3 e 27,8	Sacarose	20,0
$MnSO_4.4H_2O$	16,9	Agar	6,0
$ZnSO_4.7H_2O$	8,59		
H_3BO_3	6,2		
KI	0,83		
$NaMoO_4.2H_2O$	0,2505		
$CuSO_4.5H_2O$	0,25		
$CoCl_2.6H_2O$	0,25		

[1] O meio de cultura N7 original é suplementado com 164,66 $mg.L^{-1}$ de $CaCl_2.2H_2O$

Tabela 2: Tratamentos empregados e doses de cálcio sob a forma de $CaCl_2.2H_2O$

TRATAMENTO	Ca^{+2} mmol.L^{-1}	TRATAMENTO	Ca^{+2} mmol.L^{-1}
1	0	14	6,12
2	0,5	15	6,62
3	1,00	16	7,12
4	1,12 *	17	7,62
5	1,62	18	8,12
6	2,12	19	8,62
7	2,62	20	9,12
8	3,12	21	9,62
9	3,62	22	10,12
10	4,12	23	10,62
11	4,62	24	11,12
12	5,12	25	11,62
13	5,62	26	12,12

* Concentração de Ca^{+2} no meio N7 (Simola, 1985) na forma de $CaCl_2.2H_2O$

4.2. Avaliação dos calos obtidos

Inicialmente, como estudo piloto, foi medido semanalmente o aumento da massa fresca do material vegetal por um período de 4 semanas, sendo a semana 1 correspondente à inoculação do hipocótilo. Para a pesagem, os calos foram retirados do meio de cultura, lavados em água deionizada, secos em papel de filtro e pesados imediatamente em balança analítica.

Com auxílio de microscópio estereoscópio, os calos já pesados, foram avaliados quanto à cor, textura, oxidação e resposta morfogênica.

4.3. Determinação da concentração de cálcio nos calos através de Espectrometria de Raios-X

4.3.1 Preparo das amostras

Os calos, aos 20 dias de cultivo nos diferentes tratamentos com cálcio, foram inseridos diretamente em celas de polietileno com 32 mm de diâmetro externo X 20 mm de altura, com o fundo selado com filme de Mylar™ (polietileno terftalato) de 2,5 μm de espessura, transparente a raios-X. As irradiações foram realizadas em triplicata, sem qualquer tipo de preparo prévio (método não-destrutivo), o que possibilitou que as mesmas fossem utilizadas posteriormente na histologia, aumentando a precisão das medidas e reduzindo tanto o número de amostras como o número de análises.

4.3.2. Determinação de cálcio

As amostras foram irradiadas usando-se o equipamento de Fluorescência de Raios-X de Energia Dispersiva (Spectrace 5000), nas seguintes condições de operação: Voltagem aplicada ao tubo de raios-X = 15 kV; Corrente aplicada ao tubo de Raios-X = 0,05 mA; Tempo de irradiação = 100 s; Filtro usado = Celulose.

Primeiramente, foram irradiados padrões de cálcio em água nas concentrações de 0, 120, 240, 360, 480 e 600 $\mu g \cdot mL^{-1}$ para quantificar, usando calibração linear, o teor de cálcio na água que foi usada para preparar os cultivos com tratamento de cálcio. A concentração de cálcio no ágar (em pó e gelatificado) também foi determinada, usando as mesmas condições operacionais descritas anteriormente. Para a

determinação da concentração de cálcio no ágar gelatificado, foram retiradas 5 porções (4 retiradas em círculo, abrangendo toda a placa e uma do centro da placa) de cada uma das 3 placas preparadas, de forma que foi possível retirar discos de ágar de todas as regiões da placa de Petri. Para quantificar as amostras de calo, foi usado um padrão certificado de flor de cravo (amostra de número 883 da *International Plant-Analytical Exchange*) gentilmente cedida pelo IAC (Instituo Agronômico de Campinas), com teor de 1,91 ± 0,15 g de cálcio/ 100 g de amostra. Como método matemático de calibração do teor de cálcio nos calos foi usado o de "Parâmetros Fundamentais", cujo software de operação consta do pacote do equipamento utilizado.

4.4. Quantificação de Proteínas Totais (Método de Bradford, 1976)

4.4.1. Extração de Proteínas

** Preparo da Solução de extração*

- 4 mL de Tampão Tris-HCl pH 6.8
- 1,6 mL de mercaptoetanol
- 6,4 mL de SDS 10 % (P/V)
- 6,4 mL de glicerol
- 3,2 mL de DMSO
- 1 - 3 g de PVP
- 10,4 mL de água destilada deionizada

Amostras de 150 mg (peso da matéria vegetal fresca) de calos foram coletadas e maceradas em gral de porcelana com 5 mL da solução de extração. Após macerado, o material vegetal permaneceu 1 h em reação à temperatura ambiente e, em seguida a mistura foi aquecida

até ferver, permanecendo em reação por 3 min. Após esfriamento, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 300 s, obtendo-se desta forma o extrato bruto. O sobrenadante foi coletado com auxílio de pipeta de Pasteur e foi utilizado para a quantificação do teor de proteínas totais.

4.4.2. Quantificação de Proteínas Totais

** Preparo da Solução estoque de BSA (albumina bovina)*

Pesou-se 0,5 mg de BSA / mL de NaCl 0,5 M

** Preparo da solução de Coomassie Brilliant Blue G 250*

Em balão volumétrico de 1 L foram dissolvidos 100 mg de Commassie Brilliant Blue em 50 mL de etanol. A solução foi agitada vigorosamente e, lentamente foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico concentrado. Completou-se o volume com água destilada deionizada e filtrou-se a em papel Whatman n° 1.

** Preparo da curva analítica de calibração e leitura das amostras*

A curva analítica de calibração foi realizada em duplicata com os seguintes padrões: 0; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120; 140; 150 mg de albumina.L^{-1}.

Completou-se o volume para 500μL com solução de NaCl 0,5 M sendo que o volume final foi completado para 5 mL com a solução de Coomassie. A curva analítica de calibração foi estabelecida a 595 nm em espectrofotômetro e com ela obteve-se a equação da reta através da qual foi possível a determinação do teor de proteínas totais em cada tratamento na forma de mg de proteína.g^{-1} de material vegetal fresco. Para a quantificação dos teores de proteínas totais nas amostras,

adicionou-se 50 μL de amostra a 4,5 mL de solução de Coomassie e procedeu-se à leitura a 595 nm.

4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

4.5.1. Extração de Proteínas

** Preparo da Solução de extração*

- 4 mL de Tampão Tris-HCl pH 6,8
- 1,6 mL de mercaptoetanol
- 6,4 mL de SDS 10 % (m/V)
- 6,4 mL de glicerol
- 3,2 mL de DMSO
- 1 - 3 g de PVP
- 10,4 mL de água destilada deionizada

Amostras de 150 mg (peso da matéria vegetal fresca) de calos foram coletadas e maceradas em gral de porcelana com 5 mL da solução de extração. Após macerado, o material vegetal permaneceu 1 h em reação à temperatura ambiente e, em seguida a mistura foi aquecida até ferver, permanecendo em reação por 3 min.

Após esfriamento, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 300 s, obtendo-se desta forma o extrato bruto; o sobrenadante foi coletado com auxílio de pipeta de Pasteur e foi utilizado para a eletroforese.

4.5.2. Eletroforese em SDS-PAGE

** Preparo dos géis*

Os reagentes utilizados no preparo dos mini géis de poliacrilamida encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Composição dos mini géis utilizado na eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas totais.

Componentes	Gel "Staking"	Gel de Corrida
Água deionizada	9,3	4,7
Tris-HCl pH 6,8	1,9	5,0
Acrilamida	2,0	10,0
APS	100 μL	100,0 μL
TEMED	15,0 μL	20,0 μL
SDS (10 %)	-	100,0 μL

Durante o endurecimento do gel "staking" foram formados os poços onde os extratos protéicos (15 μg) foram inseridos. Após este procedimento, os géis foram levados para dentro da cuba de eletroforese cheia com solução tampão de corrida (10 mL de TRIS-HCl pH 8,3 em 490 mL de água deionizada) e, em geladeira, procedeu-se à corrida eletroforética, utilizando fonte para eletroforese (Pharmacia EPS 300) com corrente elétrica de 40 mA e um tempo de 2 h.

** Coloração dos géis*

Após a corrida os géis foram lavados três vezes em água deionizada durante 5 minutos sob agitação e, em seguida, imersos no reagente Gelcode® (Pierce) até o aparecimento das bandas, e então lavados e mantidos em água deionizada. Posteriormente, os géis foram avaliados, fotografados e filmados em analisador de imagens.

4.6. Determinação de carboidratos não-estruturais totais- Método da Antrona (Yenm and Willis, 1954)

4.6.1. Extração

Foram pesadas 250 mg (peso da matéria vegetal fresca) de calos de cada tratamento. Estas foram maceradas em gral de porcelana em 10 mL de etanol 80 % (V/V), filtradas com papel de filtro Wattman e o volume recolhido foi mantido em estufa a 60 ° C até a total evaporação do álcool (aproximadamente 4 horas). Após evaporação, deu-se uma re-suspensão do material que ficou aderido no fundo do frasco em 20 mL de água destilada deionizada.

4.6.2. Determinação com reagente de antrona

** Preparo do reagente*

- 100 mg de antrona
- 45 mL de ácido sulfúrico concentrado diluído em 5 mL de água destilada deionizada
- Deixa-se a solução esfriar e aguarda-se 30 minutos, agitando ocasionalmente

** Preparo da Curva analítica de calibração de Glicose*

Foi preparada uma curva analítica de calibração com os seguintes padrões de glicose: 0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; 200 mg de glicose.L^{-1} . De cada padrão, pipetou-se 1 mL e em seguida foram adicionados 7 mL do reagente antrona. A solução foi agitada e aquecida em água fervente durante 10 minutos. Após esfriamento em gelo, procedeu-se à leitura a 625 nm em espectrofotômetro obtendo-se a curva analítica de calibração e a equação da reta que melhor se adaptou aos pontos obtidos. Procedeu-se então à leitura das amostras, e com a

equação obtida mediante a curva analítica de calibração, foi possível a estimativa da concentração de carboidratos não-estruturais totais (em mg de glicose.g $^{-1}$ de material vegetal fresco) para cada tratamento proposto.

4.7. Determinação da atividade específica da peroxidase

4.7.1. Extração da enzima

** Preparo da Solução de extração*

- 6 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,0
- 1 % de PVP

Amostras de calos com 300 mg (peso da matéria vegetal fresca) foram maceradas na solução de extração em gral de porcelana sobre placa de gelo. Após maceradas foram levadas à centrífuga (Sorwall - RC5) para centrifugação a 20000 *g* durante 25 min a 4° C. O sobrenadante foi coletado e mantido em banho de gelo para posterior determinação da atividade de peroxidase.

** Determinação da Atividade Específica da Peroxidase*

Foi determinada a 30 ° C através do método espectrofotométrico direto (Hammerschimidt et al., 1982). A solução utilizada para leitura foi uma mistura composta por 2,9 mL de uma solução contendo 250 μL de guaiacol (Fluka)+ 306 μL de peróxido de hidrogênio (Merck) em 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,0 e 100 μL de extrato enzimático.

A cinética da reação foi seguida por 1 min em espectrofotômetro (Hitachi U 2000) a 470 nm. Os resultados foram expressos como atividade específica da peroxidase (Δ unidades de

absorbância.min^{-1}.mg^{-1}proteína), levando-se em consideração a quantificação de proteínas nos tratamentos realizados.

4.8. Histologia

Calos de todos os tratamentos, provenientes da quantificação de cálcio via fluorescência de raios-X, foram fixados em mistura de MacDowel (50 mL de glutaraldeído 1 % (V/V), 20 mL de paraformaldeído a 4 % (V/V) e 30 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2) durante 48 h em geladeira e levados para bomba de vácuo durante 24 horas. Em seguida, os calos passaram por processo de desidratação em série etílica, à temperatura ambiente, em concentrações crescentes de álcool etílico [de 10 a 100 % (V/V)], permanecendo durante 10 minutos em cada uma delas.

Após este período deu-se o processo de infiltração, em temperatura ambiente, utilizando uma solução composta por uma mistura contendo 50 mL de resina líquida e 0,5 g de pó ativador. Os calos permaneceram nesta solução durante um período de 24 h à temperatura ambiente e sob vácuo. A infiltração finalizou quando a amostra mostrou-se translúcida e ocupou o fundo do frasco.

Finalizada a infiltração, procedeu-se à fase de polimerização, onde a amostra foi embebida em historesina na seguinte proporção: 15 mL de historesina : 0,5 g de ativador : 1 mL de endurecedor. Esta solução foi então disposta em moldes de polietileno juntamente com a amostra, a qual foi colocada de acordo com a orientação desejada do corte. A placa com os moldes foi colocada em estufa a 40° C até polimerização da resina. Os blocos com a amostra foram retirados dos moldes, colados a uma base de madeira e levados à estufa para secagem da cola. Uma vez

secas, as amostras foram seccionadas (0,5 μm de espessura) em micrótomo rotativo.

Uma vez cortadas e dispostas nas lâminas (8 cortes por lâmina), as amostras foram coradas com solução de azul de toluidina 1 % (V/V) durante 15 minutos à temperatura ambiente e lavadas em água destilada. Algumas amostras foram coradas diretamente para avaliação histoquímica de proteínas e amido, utilizando para isso os corantes naftol blue black (1 % (V/V) durante 1 minuto) e cloreto de zinco iodado (66,67 % $ZnCl_2$: 3,33 % KI : 1,67 % I_2 em 30 mL de água deionizada durante 3 minutos) respectivamente. As lâminas com as amostras secaram à temperatura ambiente durante 24 horas e após secagem total das lâminas, as lamínulas foram coladas com Entellan (Merck) e preparadas para avaliação e filmagem das imagens.

As imagens foram obtidas através do acoplamento do microscópio óptico com o microcomputador em um sistema de análise de imagens cujos softwares empregados foram OPTIMA 6.2. e TCI PRO 2.0.

4.9. Análise dos dados

Todos os dados foram expressos na forma de média e desvio-padrão. As análises foram feitas em triplicata e uma curva de regressão linear ajustou os dados nos gráficos.

Para avaliação da interação entre todas as variáveis medidas, e, visando agrupar os tratamentos semelhantes, foi utilizada a análise multivariada de componentes principais (PCA). Os resultados da análise foram apresentados em um gráfico de ordenação onde as distâncias entre os tratamentos correspondem ao grau de variabilidade

entre eles. Para realização desta análise foi utilizado o "software" PC-ORD versão 2,0 para análises multivariadas de dados ecológicos.

Capítulo 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Indução de calos

5.1.1. Aumento da massa fresca e avaliação morfológica dos calos cultivados em picloram

Este ensaio inicial teve como objetivo determinar o peso médio dos calos e averiguar o início de sua formação, visando uma estimativa da quantidade de calos necessária por tratamento para atender à demanda das análises bioquímicas e também para averiguar o desenvolvimento do calo na presença do picloram, antes da adição das doses de cálcio.

Através da Figura 1, pode-se verificar que houve uma tendência crescente no aumento de massa, indicando que o melhor período de coleta seria a terceira semana de cultivo, já que não existiram diferenças significativas entre as massas dos calos da terceira e da quarta semanas .

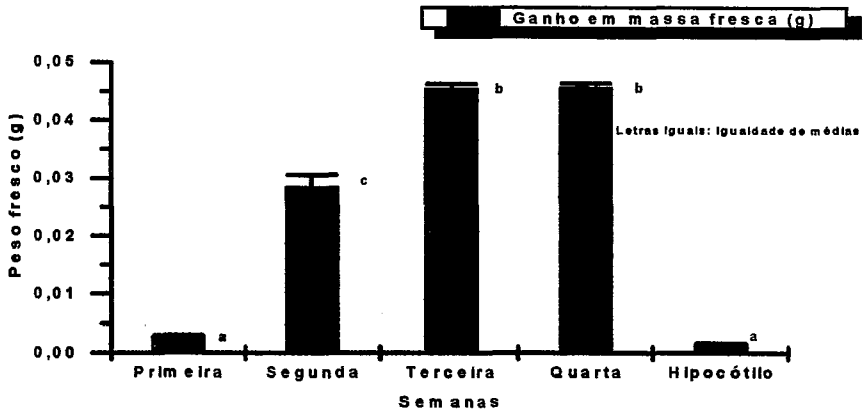

Figura 1: Variação na massa fresca dos calos de *E. urophylla* em meio de cultura N7 + 5,0 mg.L^{-1} de Picloram aos 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo em relação ao hipocótilo recém inoculado.

O ganho em massa fresca foi considerado como indicativo da formação e crescimento dos calos. Nota-se na Figura 1 que a diferenciação do hipocótilo em calo começa na segunda semana de cultivo e segue até estabilizar entre a terceira e a quarta semanas; entretanto, o acompanhamento morfológico dos calos indicou a terceira semana de cultivo como mais eficiente do ponto de vista tanto da massa fresca como também das características externas do calo, que ainda não apresentavam-se diferenciados, mas apenas induzidos e, portanto, em condições ideais para o experimento. A escolha de cultivar o calo por 3 semanas levou em conta o menor tempo de exposição à auxina, já que de acordo com Komamine et al. (1990), um período longo de exposição à auxina pode inibir a formação de calos embriogênicos e de embriões somáticos.

Através das avaliações morfológicas, foi possível a obtenção dos dados da tabela 4 e da Figura 2, onde foram verificadas as diferenças significativas entre os diferentes períodos de cultivo, a capacidade de

indução de calos e as características morfogênicas obtidas. O tipo de calo predominante foi friável-nodular, com coloração variando entre o verde claro e amarelado (Figura 3).

Tabela 4: Análise dos calos induzidos a partir de hipocótilos de *E. urophylla* cultivadas em meio de cultura N7 + 5,0 mg.L^{-1} de Picloram aos 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo.

Picloram	Calos Friáveis (%)	Calos Compactos (%)	Indução (%)	Coloração	Resposta Morfogênica
7 dias	0	0	0	Verde	Hipocótilos discretamente entumecidos (nível 0 *)
14 dias	20	0	20	Verde	Hipocótilos entumecidos (nível 1)
21 dias	90	0	90	Creme	Início de enrugamento superficial
28 dias	80	0	80	Amarelado	Enrugamento superficial avançado

* Nível 0: Início de entumecimento. Nível 1: Entumecimento parcial do explante

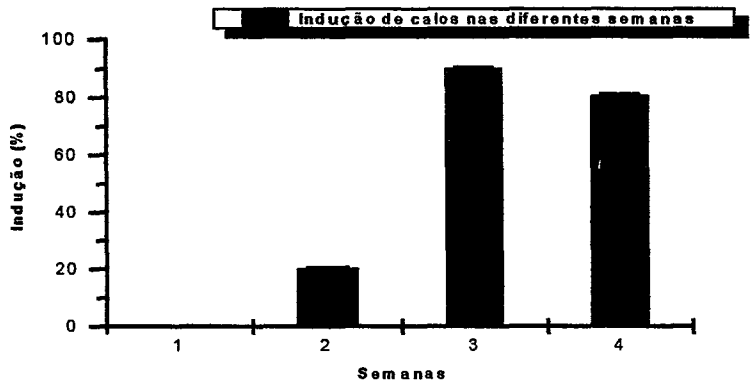

Figura 2: Indução de calos de *E. urophylla* no meio de cultura N7 + 5,0 mg.L^{-1} de Picloram nas diferentes semanas avaliadas.

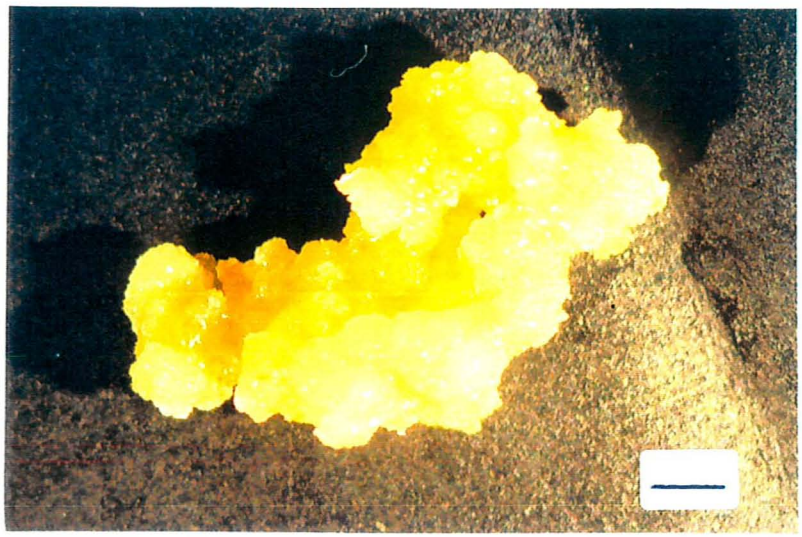

Figura 3: Calo de E. urophylla aos 20 dias de cultivo em meio de cultura N7 + 5,0 $mg.L^{-1}$ de Picloram, apresentando enrugamento superficial e coloração verde-amarelada. Bar = 620 μm

5.2. Determinação analítica do Cálcio

A utilização da técnica de espectrometria de raios-X permitiu quantificar o cálcio nas amostras usadas para histologia, aumentando a precisão dos resultados obtidos e reduzindo o número de amostras.

Através das análises realizadas e dos resultados obtidos na Figura 4, foi verificada a existência de uma tendência crescente na absorção do cálcio em relação ao aumento das doses fornecidas. Entretanto, a partir do tratamento 18 (8,12 $mmol.L^{-1}$) observou-se uma tendência à estabilização. Neste caso, seria possível de acordo com Marmé (1988) que ao atingir determinadas concentrações, o cálcio passe a ser armazenado em organelas celulares, como é o caso das mitocôndrias para ser posteriormente eliminado. Outra possibilidade,

seria a de que o cálcio pudesse ficar retido nas membranas celulares ou depositar-se na parede celular.

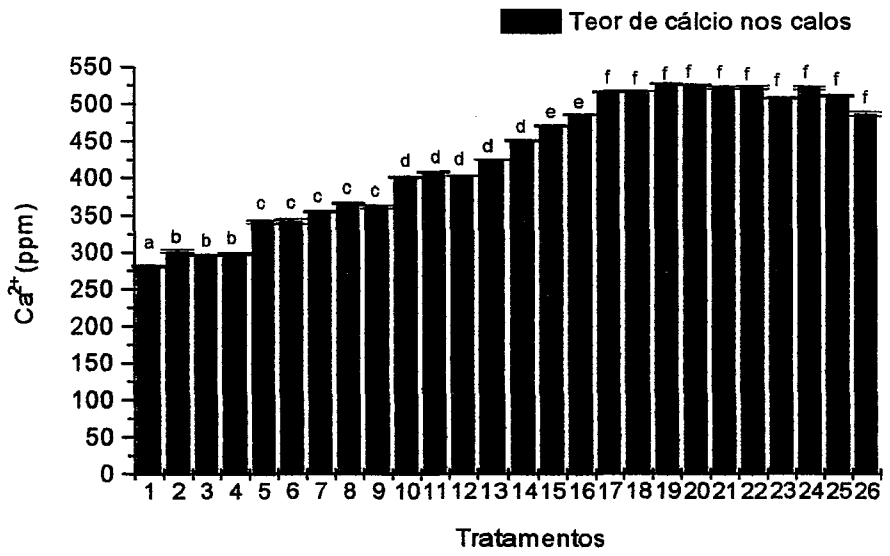

Figura 4: Conteúdo de cálcio determinado por fluorescência de raios-X nas amostras de calos de *Eucalyptus urophylla* após 20 dias de cultivo no meio de cultura descrito por Simola (1985) suplementado com diferentes concentrações de cálcio.

Através da Figura 4 verificou-se que no tratamento isento de cálcio (T1) foi quantificado 0,0280 % de cálcio; parte deste cálcio poderia ser considerado tanto como inerente ao material vegetal, proveniente de processos relacionados com a germinação ou outros processos metabólicos, como também pode ser devido a outra fonte possível de íons cálcio, como o ágar (0,0157 % ± 0,001 de Ca^{2+}). Uma vez que a absorção de elementos minerais pelas plantas não é seletiva, é provável que o cálcio proveniente do ágar também tenha sido absorvido pelos calos e, conseqüentemente, quantificado pelo fluorescência, o que explicaria o teor de cálcio quantificado no tratamento 1 e também os

possíveis aumentos de absorção em relação ao teor de cálcio fornecido no experimento.

Através da análise de variância entre as médias dos diferentes tratamentos, verificou-se que existem diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de probabilidade p = 0,05 sendo $F_{crítico}$ = 23,18836 e $F_{tabelado}$ = 1,7. Através da aplicação do teste *t* para comparação das médias, verificou-se os tratamentos que diferem entre si, os quais estão indicados na figura 4, onde letras iguais indicam ausência de diferenças entre as médias.

A tabela 5, mostra as variações na proporção de cálcio absorvida pelos explantes em função dos tratamentos aplicados, evidenciando que nas maiores doses os calos passam a absorver proporções menores do cálcio fornecido quando comparadas às doses menores.

Tabela 5: Porcentagem de cálcio absorvida pelos calos de *E. urophylla* nos diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS	% ABSORVIDA	TRATAMENTOS	% ABSORVIDA
1	-	14	84.8
2	97.7	15	85.13
3	90	16	85.4
4	89.8	17	87
5	96.9	18	84.5
6	91.6	19	83.2
7	90.0	20	80.6
8	89.1	21	77.3
9	83.1	22	75.2
10	88.7	23	71.1
11	86.4	24	71.1
12	81.9	25	67.7
13	82.4	26	73.2

Inicialmente a absorção é da ordem de 90 % (em média), em seguida passa a 80 % para finalmente estabilizar-se na faixa dos 70 % (em média). Este fato poderia indicar uma provável saturação do material vegetal por cálcio, e como conseqüência desta saturação, diminuição da % de absorção. O tratamento 1 não foi considerado por tratar-se do tratamento isento de cálcio e pelo fato de que o cálcio quantificado não foi proveniente do experimento.

5.3. Quantificação de Proteínas Totais

A Figura 5 mostra a curva analítica de calibração obtida para a quantificação do teor de proteínas totais no material vegetal, a qual apresentou-se adequada (R^2=0,98) para a leitura das amostras dos diferentes tratamentos utilizados.

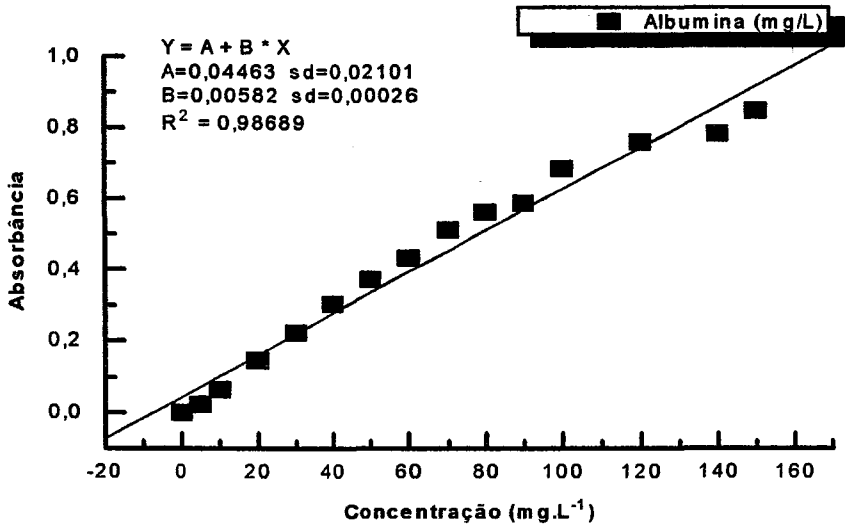

Figura 5: Curva analítica de calibração para albumina.

Na Figura 6, é possível observar uma relação entre o cálcio fornecido e o aumento no teor de proteínas totais de forma similar ao observado para o teor de açúcares totais. Pode-se verificar também que o tratamento 1 apresentou a menor concentração de proteína, evidenciando o papel do cálcio nos processos metabólicos como já foi sugerido por outros autores (Hepler e Wayne, 1985; Grover, 1998).

Poderia-se argumentar que na ausência de cálcio, havendo diminuição do teor de proteínas, os processos de diferenciação celular poderiam ser comprometidos e, conseqüentemente, as respostas aos estímulos aplicados poderiam ser restringidas. Essa afirmação corrobora com as afirmações de Scandalios (1974), segundo o qual, existe uma síntese e/ou degradação contínua tanto de proteínas estruturais como de enzimas específicas que interferem no curso da diferenciação celular.

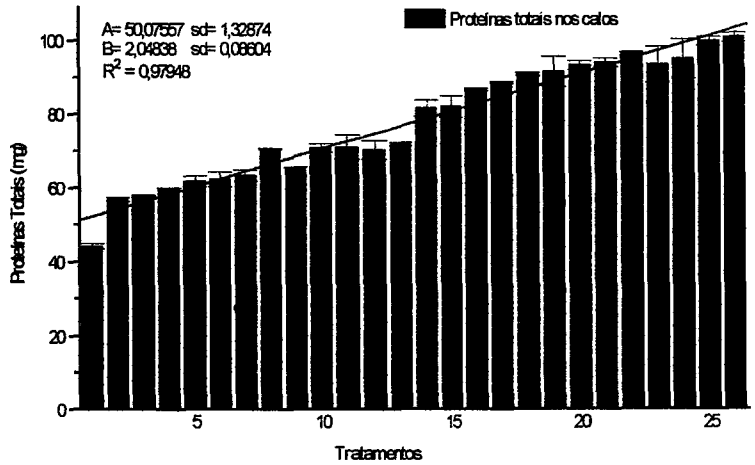

Figura 6: Conteúdo de proteínas totais determinado pelo Método Bradford (1976) em amostras de calos de *E. urophylla* após 20 dias de cultivo em meio de cultura descrito por Simola (1985) suplementado com diferentes concentrações de cálcio.

O aumento no teor de proteínas apresenta um pico a partir do tratamento 14 (6,12 mmol.L $^{-1}$) e através da análise do gráfico de cálcio (Figura 4), verifica-se que é a partir do tratamento 14 que o teor de cálcio começa a atingir valores mais elevados com estabilização a partir do T18 (8,12 mmol.L $^{-1}$); este comportamento entre os dois gráficos indicam um relação positiva entre aumento do teor de cálcio e o favorecimento da síntese e acúmulo de proteínas, além de indicar uma região possivelmente responsiva em relação à expressão morfogenética.

5.4. Determinação de carboidratos não-estruturais totais

Na Figura 7 tem-se a curva analítica de calibração obtida para os padrões utilizados. Pode-se verificar que o valor de R^2=0,99 foi altamente satisfatório, o que permitiu dar prosseguimento à análise das amostras.

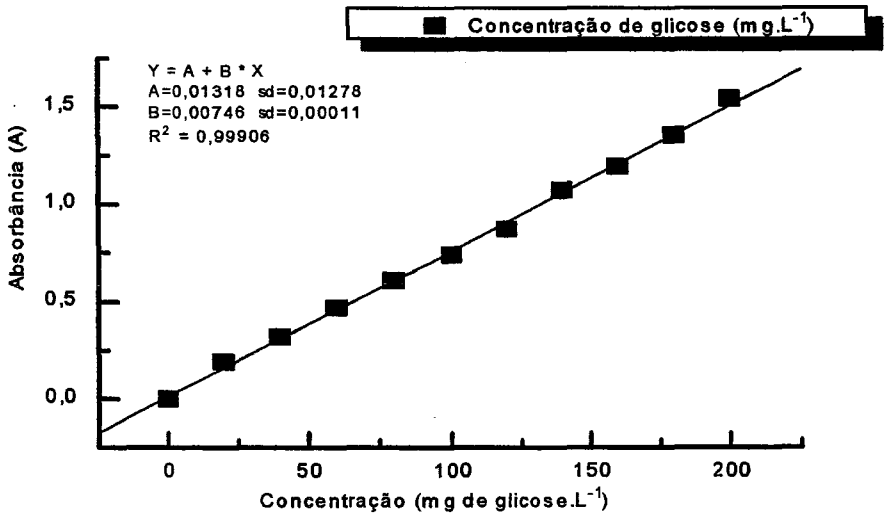

Figura 7: Curva analítica de calibração para glicose

Nota-se através da Figura 8, uma tendência crescente no acúmulo de açúcares em relação às doses de cálcio fornecidas em cada tratamento, indicando que o cálcio estaria agindo de maneira positiva no acúmulo de açúcares nos calos.

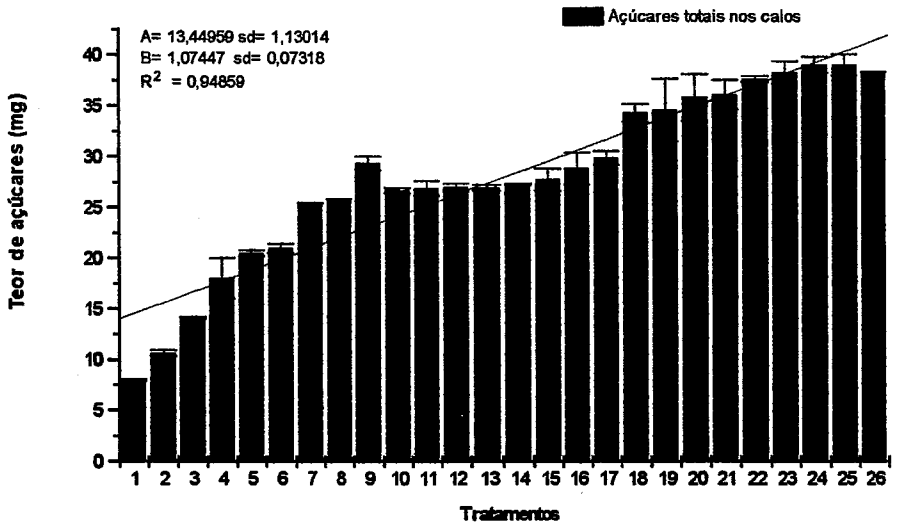

Figura 8: Conteúdo de açúcares totais em amostras de calos de *E. urophylla* após 20 dias de cultivo em meio de cultura descrito por Simola (1985) suplementado com diferentes concentrações de cálcio.

Em T1 (não fornecimento de cálcio), nota-se uma redução do teor de açúcares em relação aos demais tratamentos, diferindo significativamente das demais médias observadas e indicando possível interferência deste cátion no metabolismo de açúcares.

Dada à importância das moléculas de açúcar nos processos metabólicos (Lehninger, 1975) e dado que alguns autores (Kikuchi et al., 1995; Yeo et al., 1998; Magnaval et al., 1997) observaram variações no teor ou no tipo de açúcares predominantes em calos embriogênicos,

indicando que nestes tipos de calos os níveis de açúcares são maiores que nos calos não-embriogênicos, pode-se esperar que os calos que apresentaram maiores níveis de açúcares respondam mais favoravelmente à indução de um processo embriogênico.

A relação entre cálcio e teor de açúcares totais pode ser melhor compreendida quando se comparam as Figuras 4 e 8, e se verifica que nas regiões onde o cálcio foi mais acumulado, os teores de açúcares foram superiores. Verifica-se que, em média, na região onde a curva de cálcio inicia uma estabilização, os teores de açúcares também começam a estabilizar-se.

5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas totais

A figura 9 mostra as bandas de proteínas totais obtidas com a eletroforese em gel de poliacrilamida.

Na análise dos géis, aparentemente não foram observadas diferenças marcantes entre as bandas de proteínas. Apenas, alterações na coloração das bandas, principalmente comparando-se os tratamentos 1 e 26. As bandas apresentando estas alterações foram correlacionadas com a banda padrão de proteínas, e através de estimativas do peso molecular, as bandas estavam localizadas aparentemente entre as faixas 8 - 9 do padrão, o que corresponde a proteínas com peso molecular aproximado de 23 - 24 kDa. De acordo com alguns autores, (Chen et al.,1987; Kiyosue et al., 1991), proteínas de peso molecular variando de 20 a 40 kDa, foram relacionadas ao processo de embriogênese somática.

Entretanto, de forma geral, não foram observadas variações significativas entre as bandas de proteínas; apesar de haver sido

detectado um aumento do conteúdo protéico (Figura 6) em relação ao aumento da concentração de cálcio fornecida, não houve formação ou deleção de proteínas.

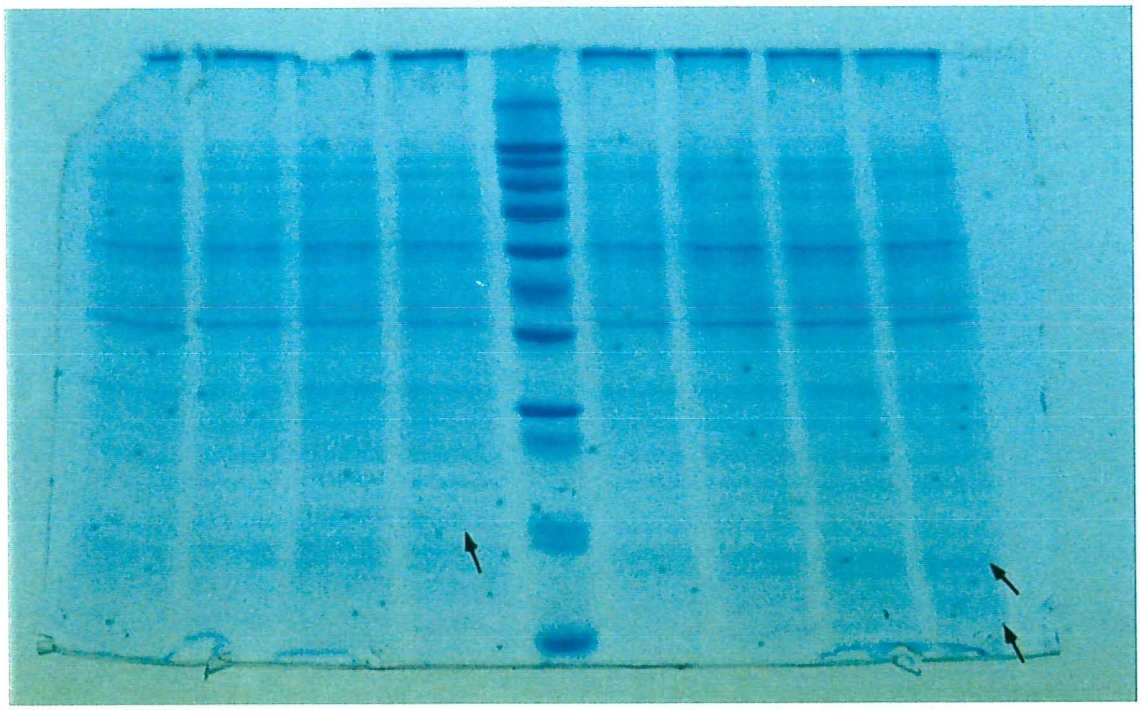

Figura 9: Aspectos das bandas protéicas observados nos calos de E. urophylla cultivados em meio de cultura N7 com diferentes doses de cálcio aos 20 dias de cultivo nos tratamentos avaliados. Setas indicam as bandas com diferentes intensidades de cor. Da esquerda para a direita: T1; T15; Padrão; T20; T26.

5.6. Atividade específica da peroxidase

A Figura 10, mostra a curva obtida para atividade específica da peroxidase. Através desta curva podemos notar que houve um aumento progressivo da atividade desta enzima em função do aumento

das doses de cálcio nos calos, o que poderia indicar uma correlação entre o cálcio, a peroxidase e a morfogênese.

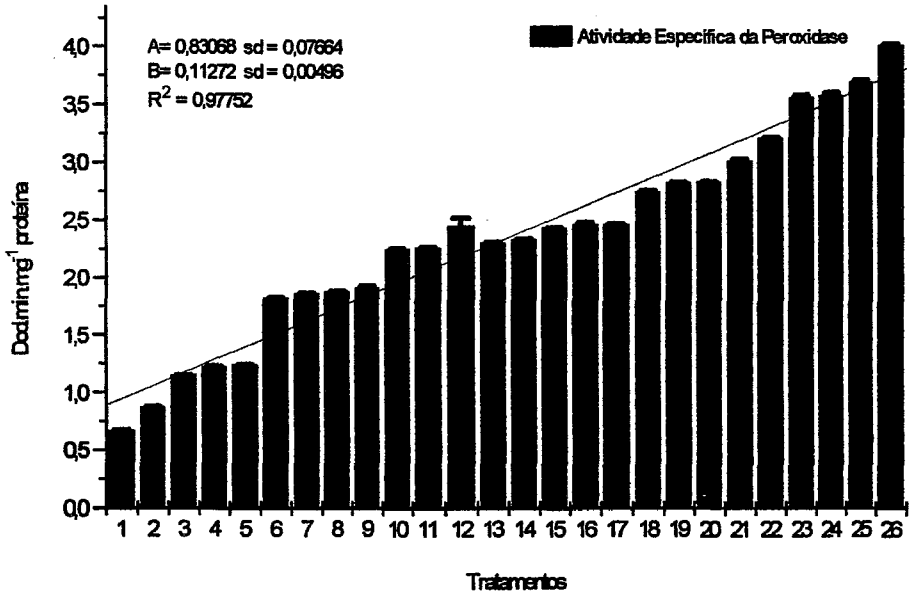

Figura 10: Atividade específica da peroxidase em amostras de calos de *E. urophylla* após 20 dias de cultivo em meio de cultura N7 suplementado com diferentes concentrações de cálcio.

Esta correlação poderia ser explicada em função de que o aumento de cálcio poderia haver induzido uma variação na produção da enzima, fator que poderia estar relacionado ao provável acúmulo de cálcio pelas células, vacúolos, retículo endoplasmático, Golgi, membrana plasmática e parede celular, os quais segundo Penel e Greppin (1979), também são sítios nos quais as peroxidases podem estar associadas.

Os resultados mostrados na Figura 10 corroboram com Hu et al. (1987), os quais observaram que, aumentando-se em 5 % a concentração de cálcio em relação ao tratamento controle, a atividade da

peroxidase também aumentou. Considerando-se o cálcio como agente essencial na sinalização de eventos metabólicos no interior da célula, é possível que ao aumentarmos as suas concentrações, sejam alterados os teores da peroxidase tornando-a uma indicadora de teores elevados de cálcio no material vegetal, e portanto, levando-nos a concluir que nos processos de diferenciação celular e morfogênese, onde a participação de cálcio é ativa (Goodwin e Brière, 1991), haveria um estímulo da peroxidase e, como conseqüência, uma variação na sua atividade específica.

Esta hipótese corrobora com trabalhos de Siegel (1993), que propõe que o crescimento e a morfogênese de plantas apresentam mudanças nos padrões da peroxidase, que resultarão em alterações no meio intracelular tão características como o são as interações planta-ambiente.

Ao observar as Figuras 4 e 10, nota-se que o aumento da peroxidase coincide com o aumento de cálcio nos calos, e neste sentido Parish (1968), observou que altos níveis de cálcio podem liberam a peroxidase da parede celular. Sticher et al. (1988), trabalhando com cultura de células de espinafre, observaram que havia liberação de peroxidase para o meio líquido e que esta liberação era favorecida por íons cálcio; os autores verificaram que em meio de cultura isento de cálcio, o nível da peroxidase liberada foi baixo.

Ao relacionar a curva obtida para atividade específica de peroxidase (Figura 10) com a curva obtida para proteínas totais (Figura 6), pode-se verificar que ambas foram crescentes em função do aumento das doses de cálcio (Figura 4) e que dentre as proteínas totais avaliadas, a peroxidase manteve-se com sua atividade crescente.

Estas alterações sugerem, em princípio, que a ocorrência da morfogênese e mesmo da diferenciação celular estejam ligadas a fatores bioquímicos e metabólicos e que estes eventos poderiam ser, em parte, diretamente controlados por determinadas enzimas e seriam desencadeados quando um ponto ótimo do sistema é atingido. Um destes "pontos ótimos" aparentemente poderia ser o teor de cálcio, que estaria atuando diretamente no sistema.

Scandalios (1974) comenta que a diferenciação celular leva a um desenvolvimento morfológico e à especialização da função e devido a isso, existe uma síntese contínua e/ou degradação de enzimas específicas e proteínas estruturais. Exemplos destas interações podem ser obtidos em trabalhos de Van Huystee et al. (1992), segundo o qual, a peroxidase relaciona-se com o AIA, que aparece em altas concentrações nos tecidos meristemáticos e também com outras substâncias reguladoras da diferenciação celular e de outros eventos morfogênicos.

Algumas referências que mencionam o envolvimento da peroxidase na embriogênese somática comentam que durante o período de indução do embrião a atividade da enzima foi superior em relação aos calos não embriogênicos (Lal et al., 1988). El-Hadrami et al. (1989), comentam que a atividade intensa de peroxidase, entre outros fatores, constitui-se uma condição necessária para a embriogênese somática; Rout et al. (1995), observaram que durante a embriogênese somática, determinadas bandas de peroxidase foram suprimidas e outras novas foram formadas.

Em situações de estresse, a peroxidase apresenta variações na sua atividade (Levitt, 1980; Everse et al., 1991); por essa razão, consideramos que quanto maior a tendência de ocorrência de

diferenciação (em embrião ou gema), maiores flutuações podem ser esperadas na atividade específica desta enzima; entretanto, a peroxidase não seria considerada como agente direto da diferenciação mas como indicadora da ocorrência de diferenciação.

5.7. Avaliação Morfológica e Histológica

As figuras 11(A-F), 12(A-E) e 13(A-D), mostram aspectos da morfologia externa e da histologia dos calos. Nota-se na figura 11 A, que corresponde ao tratamento 1, que o explante mostra-se entumecido em toda sua extensão. Aparentemente, o estímulo para a desdiferenciação não foi atingido, sugerindo uma possível interferência do cálcio dentro deste processo. A avaliação histológica deste calo detectou a presença de células aparentemente colapsadas (Figura 12A), o que pode ser devido ao baixo teor de cálcio presente, conduzindo a uma desestruturação de parede e de membrana celulares. Eklund e Eliasson (1990), também verificaram este comportamento trabalhando com hipocótilos de *Pinus*.

Na figura 11B (=T4), é possível verificar pequenos pontos de oxidação na região central do calo e uma leve tendência de resposta ao estímulo aplicado, pois nota-se que a porção lateral do calo apresenta formação de algumas estruturas. Em 12B, tem-se o corte histológico do calo onde é possível detectar pequenos grupos de células meristemáticas, entretanto, não são observadas características organogênicas.

A formação de centros meristemáticos foi observada a partir do T7 (Figura 12C), o qual aparece isolado e apresenta uma tendência de

polarização, podendo-se notar células em divisão e nucléolos evidentes. Na figura 12D, (=T10), os centros meristemáticos foram originados a partir da epiderme do explante, sendo que estes centros apresentam-se compostos por células diferenciadas contendo vacúolos e células em divisão, caracterizando uma estrutura de características embriogênicas e indicando um provável desenvolvimento de embriões. Esta hipótese está de acordo com as observações de Micahux-Ferrière et al. (1992), segundo os quais a embriogênese somática pode estar relacionada com a formação de "clusters" meristemáticos, caracterizados por células isodiamétricas, nucléolo proeminente indicando alta síntese protéica. Segundo estes autores, estas estruturas evoluem para unidades embriônicas e dão origem a pró-embriões globulares.

Através da figura 11C, (=T14), evidencia-se a formação de um calo friável com indicativos de síntese de antocianina nas porções terminais e indícios da formação de um processo organogênico, com desenvolvimento de estruturas iniciais de gema. Este calo é composto basicamente por duas regiões: uma com acúmulo de antocianina e com características organogênicas e outra com características embriogênicas, dada principalmente pelo aspecto friável e pela coloração amarelada do calo. Ainda que antocianina seja relacionada à produção de embriões somáticos, (Muralidharan et al.,1989, Ouyang et al.1981, Termignoni, et al.,1996), as análises histológicas revelaram uma formação típica de gema (figura 12E), com os primeiros pares de folhas e o meristema apical, levando-nos a acreditar que possivelmente a exposição à luz, que é uma condição essencial na formação da antocianina, tenha favorecido à formação desta pigmentação.

Na figura 13A (=T16), é possível verificar a formação de centros meristemáticos em fase inicial de desenvolvimento e já evoluídos, para prováveis embriões somáticos de origem multicelular, os quais formaram-se na superfície do calo. A formação de embriões somáticos em estágio globular, mostrada na figura 11E (=T15), deu-se a partir da superfície do calo; histologicamente, através da figura 13B, foi possível observar que estes embriões apresentavam internamente um cilindro proteico e depósitos de amido na região protodérmica que envolve o embrião; comprovou-se também que estes embriões formaram-se na superfície do calo e que havia conexão entre o calo e o embrião formado; este tipo de desenvolvimento embriogênico deu-se em 44,44 % do total de calos utilizados dentro deste tratamento.

Embriões globulares em estágio inicial também foram observados nos tratamentos 24 (figura 13C), 25 e 26 (figura 13D), os quais apresentam-se em "clusters", ou isolados ou ainda na região periférica do calo. Segundo Michaux-Ferrière et al. (1992), a migração destes centros para regiões periféricas é devida as intensas atividades metabólicas e mitóticas destas estruturas.

A capacidade embriogênica parece ter sido expressa tanto a partir de células meristemáticas especializadas que começaram a dividir-se e formar tétrades (figura 13C-D), como também a partir da formação dos centros meristemáticos, sendo que para os tratamentos avaliados, a formação de centros meristemáticos mostrou ser o processo dominante. Os resultados obtidos corroboram com trabalhos de Halperin e Wetherell (1965), Haccius (1978), Willians e Maheswaran (1986), El Maataoui et al. (1990) e Schwendiman et al. (1988), os quais também observaram a

formação de embriões somáticos a partir de centros meristemáticos da periferia do calo.

Apesar dos resultados apontarem para uma relação positiva entre o aumento do cálcio fornecido e as demais variáveis, as avaliações histológicas detectaram que a complexidade das estruturas observadas diferiu nos tratamentos aplicados. Este fato pode estar relacionado com a estabilização do teor de cálcio no material vegetal a partir da concentração do tratamento 17, e por isso mesmo, os resultados histológicos dos tratamentos onde os níveis de cálcio estão estáveis, são basicamente semelhantes. Sugere-se também uma ação diferenciada dos mecanismos bioquímicos sobre a morfogênese, atestada pelas variações observadas nos gráficos de proteínas e açúcares totais (Figuras 6 e 8), os quais também indicam uma tendência de estabilização no momento aproximado em que os níveis de cálcio estão estabilizando.

Finalmente, com os resultados obtidos na histologia e sob as condições deste experimento, o tratamento 15 (6,62 mmol.L^{-1} Ca^{2+} sob a forma de $CaCl_2.2H_2O$) foi o mais indicado para indução de embriogênese somática em calos de hipocótilo de *Eucalyptus urophylla*.

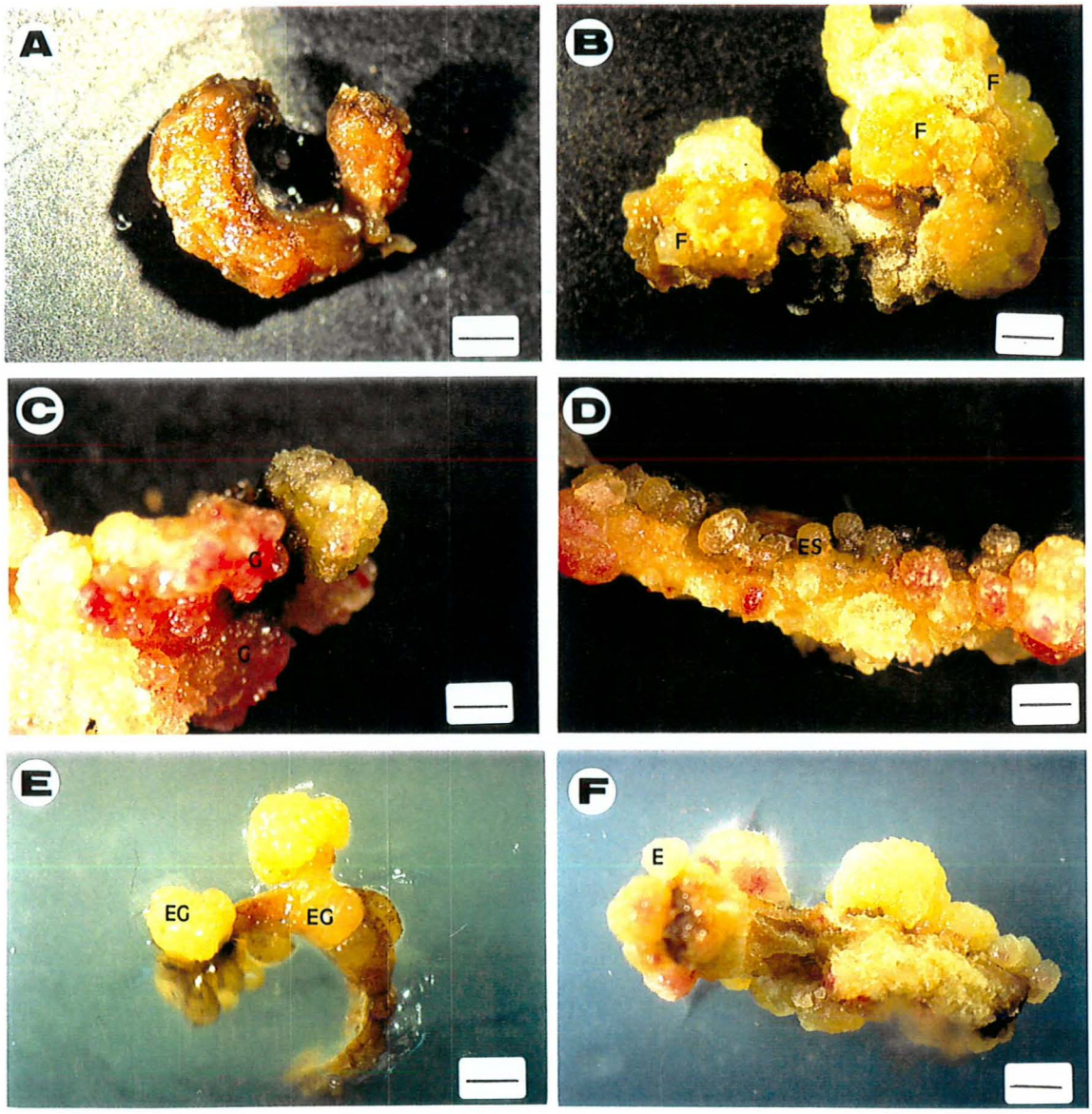

Figura 11: (A-F) Aspectos morfológicos dos calos de *E. urophylla* aos 20 dias de cultivo em N7 com diferentes concentrações de cálcio. (A) T1:Entumescimento do explante e ausência de diferenciação. Bar= 870 μm. (B) T4: Calo com regiões friáveis (**f**) e alguns pontos de oxidação. Bar= 870 μm. (C) T14: Calo organogênico mostrando o desenvolvimento de gema (**g**). Bar= 870 μm. (D) T15: Calo embriogênico mostrando embriões somáticos (**es**) originados na superfície do explante e facilmente destacáveis.Bar= 620 μm. (E) T24: Embriões somáticos em estágio globular (**eg**) obtidos diretamente do explante. Bar= 620 μm. (F) T26: Embriões globulares obtido indiretamente (**e**). Bar= 870 μm.

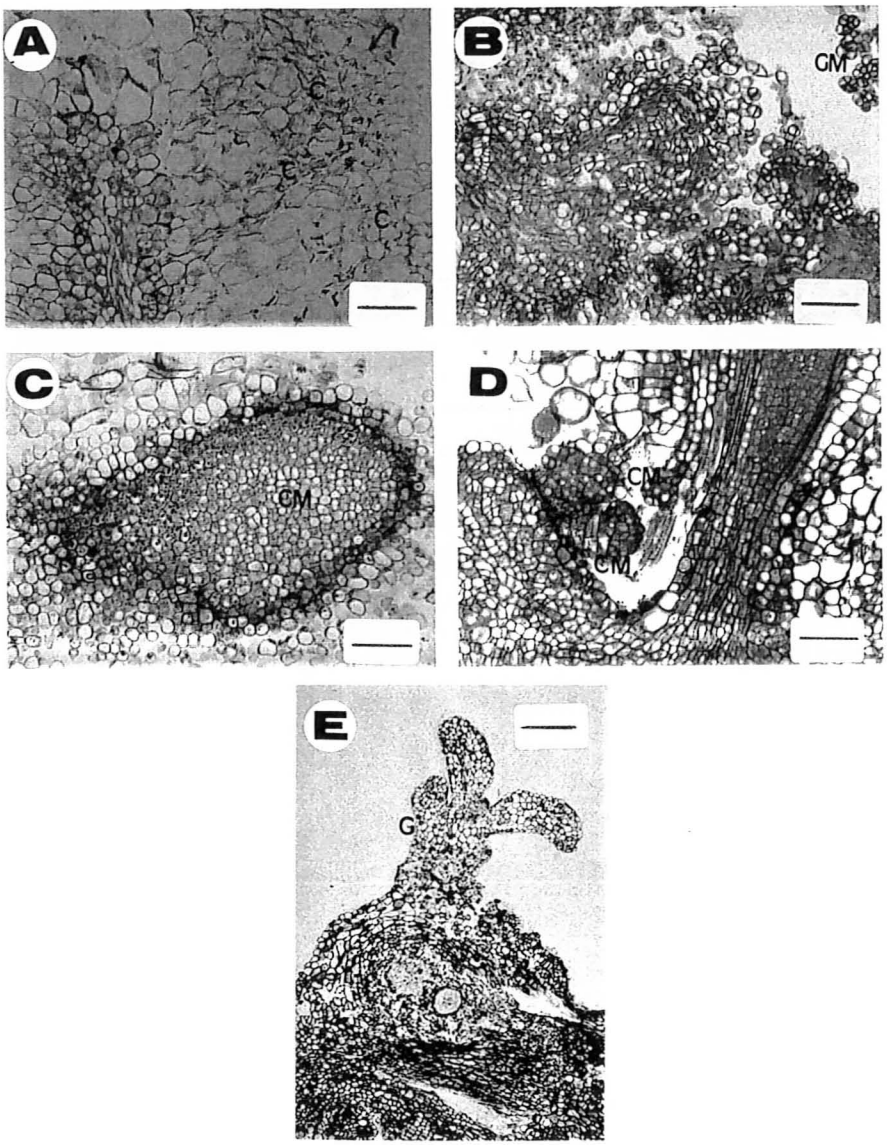

Figura 12: (A-E) Aspectos histológicos dos calos de *E. urophylla* aos 20 dias de cultivo em N7 com diferentes concentrações de cálcio. (A) T1: Secção longitudinal do calo mostrando células colapsadas (**c**) e ausência de diferenciação celular. Bar= 37,32 µm. (B) T4: Corte histológico mostrando alguns grupamentos meristemáticos (**gm**) na periferia do calo. Bar= 100,74. (C) T7: Centro meristemático (**cm**) composto por células de alta atividade mitótica formado na porção superior do calo. Bar= 37,32 µm. (D) T10: Formação de centros meristemáticos (**cm**) semelhantes a pró-embriões, desenvolvidos a partir da camada epidérmica do explante. Bar= 18,66 (E) T14: Organogênese indireta com formação de gemas (**g**) que já apresentam os primeiros pares de folhas. Bar= 100,74 µm.

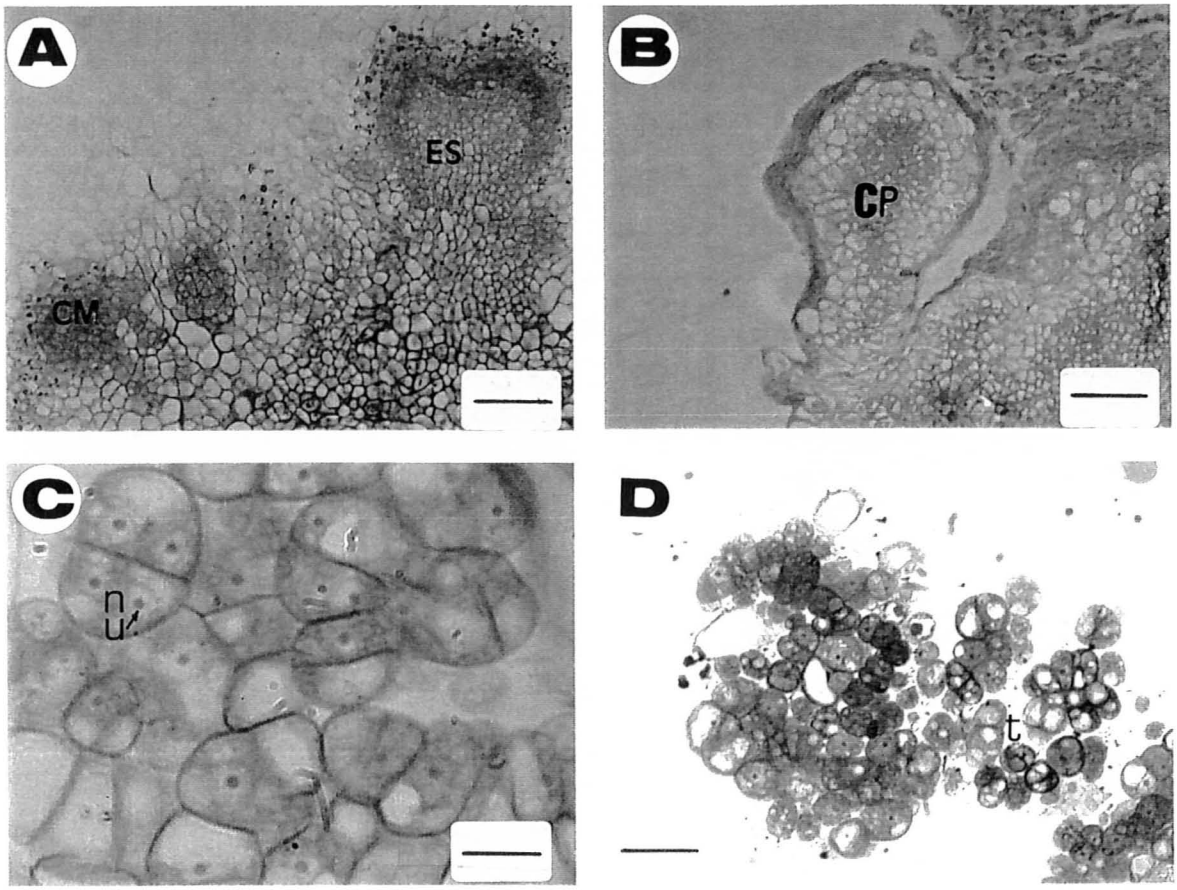

Figura 13: (A-D) Análise histológica de embriões somáticos e células embriogênicas obtidos de calos de *E. urophylla* aos 20 dias de cultivo em N7 com diferentes concentrações de cálcio. (A) T16: Centros meristemáticos em fase inicial (**cm**) e desenvolvimento de embrião somático (**es**) a partir dos centros meristemáticos da porção superior do calo. Bar=37,32 μm. (B) T15: Secção longitudinal de um embrião somático mostrando o cilindro proteico interno (**cp**) corado com naftol blue-black e facilmente destacáveis do calo devido à ausência de conexões. Bar= 37,32 μm. (C) T24: Células embriogênicas com nucléolo proeminente (**nu**) indicando alta síntese de proteínas. Bar= 9,70 μm. (D) T26: Células embriogênicas em divisão e formando tétrades (**t**). Bar= 18,66 μm.

5.8. Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de PCA (Figura 14), agrupou os tratamentos semelhantes e indicou a porcentagem de variação dos dados que foi explicada estatisticamente. No caso desta análise, o eixo 1 explicou 88,93 % da variabilidade e o eixo 2, 4,78 %; somados, os eixos explicaram 93,71 % da variabilidade dos dados, indicando alta precisão da técnica na explicação estatística dos resultados obtidos.

De forma geral, ao analisar a Figura 14, nota-se aparentemente, a existência de cinco grupos de tratamentos que diferem entre si. São eles:

Grupo 1: formado por T1
Grupo 2: formado por T2-T3
Grupo 3: formado por T4-T5-T6
Grupo 4: formado por T7-T8-T10-T11-T13-14-T15-T16
Grupo 5: formado por T18-T19-T20-T21-T22-T23-T24-T25-T26

A ordenação dos tratamentos ao longo dos eixos mostrou que a distribuição dos mesmos estava de acordo com as observações histológicas, as quais permitiram observar que o sinal mais expressivo do desenvolvimento inicial da embriogênese foi a presença de centros meristemáticos. Entretanto, a relação entre a ordenação dos tratamentos

e a histologia não foi observada para os tratamentos T9 (3,62 mmol.L $^{-1}$) e T12 (5,12 mmol.L $^{-1}$), nos quais não foram detectados indícios de desenvolvimento embriogênico. Através do gráfico da Figura 14, foi possível verificar que o tratamento 1 (não fornecimento de cálcio), apareceu isolado dos demais grupamentos, indicando diferenças entre este tratamento e os demais e corroborando o efeito do cálcio como indutor do processo morfogênico.

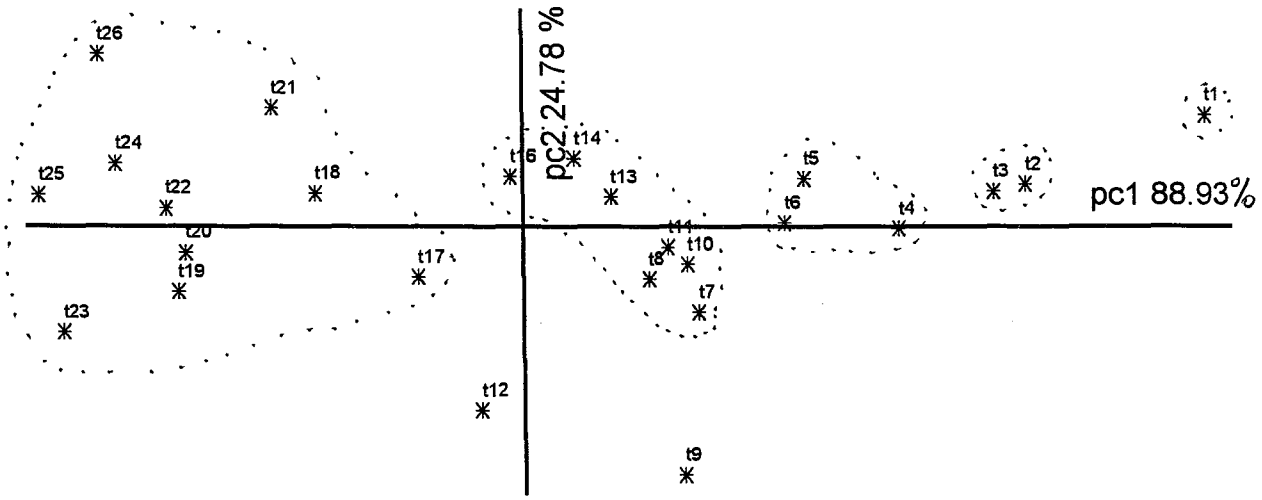

Figura 14: Análise de Componentes Principais (PCA) para as variáveis proteína, açúcares, peroxidase e cálcio, aos 20 dias de cultivo em meio de cultura N7 suplementado com diferentes concentrações de cálcio.

Dentro do grupo 4 do gráfico de PCA, os tratamentos 13-14-15-16 coincidiram com a região de incremento no aumento da concentração de cálcio, justamente antes do início da estabilização da curva (T17), a qual pode ser vista na Figura 4. Estes incrementos também foram verificados para os demais parâmetros avaliados (Figuras 6 e 8) e, portanto esta região foi considerada como a mais indicada para indução

da embriogênese, e o tratamento 15 (6,62 mmol.L $^{-1}$), como o mais eficiente.

Finalmente, foi possível observar que a interação entre todas as variáveis estudadas (proteínas, açúcares, peroxidase, cálcio), permitiu a ocorrência das alterações histológicas nos tratamentos avaliados. Aumentando-se progressivamente a concentração de cálcio, o metabolismo de açúcares e os teores protéicos responderam positivamente, oferecendo condições aparentemente favoráveis para o desenvolvimento da morfogênese, já que açúcares e proteínas são moléculas altamente requeridas em processos de crescimento, divisão celular e desenvolvimento. Alterações tanto nos teores de açúcares como no de proteínas foram relatadas como sendo características de processos embriogênicos (Kikuchi et al., 1995; Kiyosue et al., 1991; Komamine et al., 1990), levando à concluir que ao estimular o metabolismo destas moléculas, foram obtidas condições favoráveis para a expressão morfogênica. Estudos aprofundados de como ocorre a ligação entre o cálcio e a ativação destas moléculas ainda são escassos, mas não deixam de ser promissores.

Capítulo 6. CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos e nas hipóteses estabelecidas, foi possível verificar que houve influência positiva do cálcio sobre os teores de proteínas e açúcares totais bem como na atividade específica da peroxidase, e esta influência possibilitou o desenvolvimento das diferentes características histológicas do material vegetal observadas durante o período de cultivo. Com os resultados obtidos, ficou evidenciado a importância do cálcio como agente favorecedor da morfogênese em plantas. No tratamento com omissão de cálcio, foi observado redução das concentrações de açúcares e proteína totais bem como da atividade específica da peroxidase; as análises histológicas comprovaram a presença de células colapsadas e desagregadas, possivelmente como respostas ao baixo teor de cálcio e, como conseqüência, dos baixos teores de açúcares e proteínas totais.

Através da aplicação da análise de componentes principais (PCA), foi possível observar cinco grupos de tratamentos que diferiram entre si em relação à interação dos parâmetros avaliados, e, mediante análise histológica, foi comprovado que o tratamento com 6,62 $mmol.L^{-1}$ Ca^{2+} na forma de $CaCl_2.2H_2O$ favoreceu o desenvolvimento do processo embriogênico para os calos aos 20 dias de cultivo. A principal forma de obtenção dos embriões somáticos foi a partir do desenvolvimento de centros meristemáticos, compostos por células com elevada atividade

mitótica e nucléolo evidente, devido à alta síntese de proteínas. Os resultados histológicos apontaram para o desenvolvimento de embriões somáticos com origem multicelular.

Estudos futuros direcionados ao mapeamento da embriogênese serão de elevado valor para o aprofundamento das relações observadas até o presente momento bem como para o estabelecimento de marcadores da embriogênese em *Eucalyptus* .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERMAN, K.E.O.; NICHOLLS, D.G. Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial calcium transport. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v.18, p.149-201, 1983.

BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMILL, J.D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercialy important temperate eucalypt species - *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science-Limerick**, v.140, n.2, p.189-198, 1999

BLANCO, M. de los A.; NIEVES, N.; SÁNCHEZ, M.; BORROTO, C.G.; CASTILLO, R.; GONZÁLEZ, J.L.; ESCALONA, M.; BÁEZ, E.; HERNÁNDEZ, Z. protein changes associeted with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, p.153-158, 1997.

BORLE, A.B. Control, modulation and regulation of cell calcium. **Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.**, v.90, p.130-169, 1981.

BOULAY, M. Preliminary reserach on somatic embryogenesis of *Eucalyptus dunnii*. **Annales de Recherches Sylvicoles**, v.1, p.23-37, 1987.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CHEN, L.J.; LUTHE, D.S. Analysis of proteins from embryogenic and nonembryogenic rice (*Oryza sativa*) calli. **Plant Science**, v.48, p.1981-1988, 1987.

CHO-UnHAING; KASHA, K.J.; CHO, H.U. The effect of calcium on ethylene production and microspore-derived embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.146, n.5-6, p.677-680, 1995.

CUTTER, E.G. **Anatomia Vegetal. Parte I – Células e Tecidos.** São Paulo: Editora Roca, 1986. 304p.

De VRIES, S.C.; BOOIJ, H.; JANSSENS, R.; RONALD, V.; SARIS, L.; Lo SCHIAVO, F.; TERZI, M.; Van KAMMEN, A. Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. **Genes Dev.**, v.2, p.462-476, 1988.

DUSSERT, S; VERDEIL, J.L.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. **Plant Science**, v.111, p.229-236, 1995.

EKLUND, L.; ELIASSON, L. Effects of calcium ion concentration on cell wall synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v.41, p.863-867, 1990.

EL-HADRAMI, I.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M.P.; D'AUZAC, J. Polyamines, a possible limiting factor in somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.308, p.205-211, 1989.

EL-MAATAOUI, M.; ESPAGNAC, H.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragments of cork oak (*Quercus suber*) cultured in vitro. **Annals of Botany**, v.66, p.183-190, 1990.

EPSTEIN, E. **Mineral Nutrition of Plants: Principles and perspectives.** New York: Wiley and Sons Inc., 1982. 344p.

ETIENNE, H.; LARTAUD, M.; CARRON, M.P.; MICHAUX-FERRIERE, N. Use of calcium to optimize long-term proliferation of embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Mull.Arg.). **Journal of Experimental Botany**, v.48, n.306, p.129-137, 1997.

EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. AND YAMADA, Y.**Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding.** Vol.1, 1983. 964 p.

EVERSE, J.; EVERSE, K.E.; GRISHAM, M.B. **Peroxidases in Chemistry and Biology.** USA: CRC Press, 1991. 264p.

FEIJO, J.A.; MALHO, R.; OBERMEYER, G. Ion dynamics and its possible role during in vitro pollen germination and tube growth. **Protoplasma**, v.187, p.155-167, 1995.

FOSKET, D.E. **Plant Growth and Development. A molecular approach.** USA: Academic Press, 1994. 580p.

FRANK, K.D.; BURCH, J.; DENNING, J. Mineral analysis of corn leaves by x-ray-fluorescence on ground versus unground leaf samples. **Communications in soil science and plant analysis**, v.23, n.17-20, p.2415-2424, 1992.

FUKUMOTO, N.; KOBAYASHI, Y.; KURAHASHI, M. Development of a high spatial resolution x-ray-fluorescence element mapping spctrometer for nondestructive analysis of biological samples. **Bunseki Kagaku**, v.41, n.11, p.545-550, 1992.

GILL; S.S.; GILL, R.I.S. Induction of embryo like structures in *Eucalyptus terenticornis*. **Advances in Plant Sciences**, v.7, n.1, p.159-162, 1994.

GOODWIN, B.C.; BRIÈRE, C. Generic dynamics of morphogenesis. IN: MOSEKILDE, E.; MOSEKILDE, L. (Editors). **Complexity, Chaos and Biological Evolution.** New York: Plenum Press, 1991. p.281-301.

GROVER, M.; SHARMA, A.K.; DHINGRA, A.; MAHESHWARI, S.C.; TYAGI, A.K. regulation of plastid gene expression in rice involves calcium and protein phosphatases/kinases for signal transduction. **Plant Science**, v.137, p.185-190, 1998.

HACIUS, B. Questions of unicelular origin of non-zigotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology (New Delhi)**, v.28, p.74-81, 1978.

HALPERIN, W.; WETHERELL, D.F. Ontogeny of adventive embryos of wild carrot. **Science**, v.147, p.756-758, 1965.

HAMMERSCHIMIDT, R.; NUCKLES, E.M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systematic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.73-82, 1982.

HAUSE, B.; Van VEENENDAAL, W.L.H.; HAUSE, G.; Van LAMMEREN, A.A.M. Expression of polarity during early development os microspore-derived and zigotic embryos of

Brassica napus L. cv. Topas. **Bot. Acta**, v.107, p.407-415, 1994.

HEPLER, P.K.; WAYNE, R.O. Calcium and plant development. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v.36, p.397-439, 1985.

HU, C.; SMITH, R.; Van HUYSTEE, R. Biosynthesis and localization of peanut peroxidases. A comparison of the cationic and anionic isozymes.**Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.6635-6640, 1987.

JANSEN, M.A .K.; BOOIJ, H.; SCHEL, J.H.N.; De VRIES, S.C. Calcium increases the yeld of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v.9, p.221-223, 1990.

KIKUCHI, A.; SATOH, S.; NAKAMURA, N.; FUJII, T. Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non-embryogenic calli. **Plant Cell Reports**, v.14, p.279-284, 1995.

KIYOSUE, T.; SATOH, S.; KAMADA, K.; HARADA, H. Purification and i$^{mmol.L^{-1}}$ uno-histochemical detection of na embryogenic cell protein in carrot. **Plant Physiol.**, v.95, p.1077-1083, 1991.

KOMAMINE, A.; MATSUMOTO, M.; TSUKAHARA, M.; FUJIWARA, A.; KAWAHARA, R.; ITO, M.; SMITH, J.; NOMURA, K., FUJIMURA, T. Mechanisms os somatic embryogenesis in cell

cultures-physiology, biochemistry and molecular biology. In: NIJKAMP, H.J.J.; Van der PLAS, L.H.W.; Van AARRTRIJK, J. (Eds). **Progress in Plant Celular and Molecular Biology.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. p.307-313.

LAL, M.; NARAYAN, P.; JAISWAL, V.S. Induction of somatic embryogenesis and associated changes in peroxidase activity in leaf callus cultures of *Ficus religiosa* L. PROCEEDINGS OF THE INDIAN NATIONAL SCIENCE ACADEMY (PART B – BIOLOGICAL SCIENCES), v.54, n.4, p.271-275, 1988.

LEHNINGER, A.L. **Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function.** New York: Worth Publishers Inc, 1975. 1104p.

LEVITT, J. **Response of plant environmental stress.** 2 ed. New York: Academic Press,1980. 235p.

LEYDEN, D.E. Energy-Dispersive X-Ray Spectrometry. **Spectroscopy.**, v.2, n.6, p.13-18, 1992.

LUUKKANEN, O; BRUNS, S.; MATELL,S.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. Seedling biotechnology os tropical trees: a forester' view. In: BRUNS, S.; MATELL, S.; TRAGARDH, C.(Eds) RECENT ADVANCES IN BIOTECHONOLOGY FOR TREE CONSERVATION AND MANAGEMENT. PROCEEDINGS OF

AN IFS WORKSHOP, Florianópolis, Setembro, 1998. 203-213p.

MAGNAVAL, C; NOIROT, M.; VERDEIL, J.L.; BLATTES, A.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; BEULÉ, T.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutritional requirements of coconut calli (*Cocus nucifera* L.) during somatic embryogenesis induction. **J. Plant Physiol.**, v.150, p.719-728, 1997.

MALAVOLTA, E. **Elementos de Nutrição Mineral de Plantas.** São Paulo: Ceres Editora, 1980, 251p.

MALHO, R.; TREWAVAS, A. Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. **Plant Cell**, v.8, p.1935-1949, 1996.

MARMÉ, D. The role of calcium in the regulation of plant cellular metabolism. In: GERDAY, Ch.; GILLES, R.; BOLIS, L. (Eds), **Calcium and calcium binding proteins.** Berlin: Spring-Verlag, 1988, 201-208p.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of higher plants.** London: Academic Press, 1986, 674p.

MEDVEDEV, S.S.; MARKOVA, I.V. The cytoskeleton and plant polarity. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.45, n.2, p.154-164, 1998

MIAH, M.Y.; WANG, M.K.; CHINO, M. Energy dispersive x-ray – fluorescence for rapid potassium, calcium, and chloride diagnosis in barley. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, n.2, p.229-235, 1999.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; GROUT, H.; CARRON, M.P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v.79, n.2, p.174-180, 1992.

MONTORO, P.; ETIENNE, H.; MICHAUX-FERRIERE, N.; CARRON, M.P. Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, n.3, p.331-338,1993.

MURALIDHARAN, E.M.; GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v.8, n.1, p.41-43, 1989.

NOMURA, K.; KOMAMINE, A. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. **Plant Physiology**, v.79, p.988-991, 1985.

OMOTE, J.; KOHNO, H.; TODA, K. X-Ray-Fluorescence analysis utilizing the fundamental parameter method for the determination of the elemental composition in plant-samples. **Analytica Chimica Acta**, v.307, n.1, p.117-126, 1995.

PARISH, R.W. Studies on the effect of calcium and boron on peroxidases of plant cell walls. **Z. Pflanz.** ,v.60, p.211-216, 1968.

PARROTT, W.A.; MERKLE, S.A.; WILLIAMS, E.G. Somatic Embryogenesis: potencial for use in propagation and gene transfer systems. In: MURRAY, D.R. (ed) **Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology.** Wallingford: CAB International,1991, p.158-200.

PEDROSO, M.C.; PAIS, M.S. Factors controlling somatic embryogenesis. Cell wall changes as an in vivo marker of embryogenic competence. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** v.43, n.2, p.147-154, 1995.

PENEL, L.; GREPPIN, H. Effect os calcium on subcellular distribution of peroxidases. **Phytochemistry**, v.18, p.29-33, 1979.

PENNELL, R.I.; JANNICHE, L.; SCOFIELD, G.N.; BOOIJ,H.; De Vries, S.C.; ROBERTS, K. Identification of a transicional cell

state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. **J. Cell Biol.,** v.119, p.1371-1380, 1992.

PIETROBON , D.; VIRGILIO, F.O.; POZZEA, T. Structural and functional aspects os calcium homeostasis in eukaryotic cells. **European Journal of Biochemistry**, v.193, p.559-622, 1990.

POOVAIAH, B.W.; REDDY, A.S.N. calcium messenger system in plants. **CRC in Plant Science**, v.6, p.47-103, 1987.

ROBINSON, K.R.; JAFFE, L. Polarizing fucoid eggs by a calcium current through themselves. **Science**, v.187, p.70-72, 1975.

RONCHI, V.N.; GIORGETTI, L. The cell's commitment to somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed). **Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I.,** Berlin: Springer-Verlag,1995, 71-86p.

ROUT, G.R.; DAS, P. Isozyme profile during somatic embryogenesis and in vitro flowering of *Bambusa vulgaris*. **Journal of plant biochemistry and biotechnology,** v.4, n.1, p.43-45, 1995.

RUAUD, J.N.; CHURCHILL, K.; PEPPER, S.; ALTMAN, A; ZIV, M. Somatic embryogenesis initiation in *Eucalyptus nitens*. **Acta Horticulturae**, v.447, p.185-186, 1997.

SCANDALIOS, J.G. Isozymes in development and differentiation. **Ann. Rev. Pl. Physiol.,** v. 25, p.225-258, 1974.

SCHUMANN, G.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J.; KLOCKE, E. Anatomy of Somatic Embryogenesis. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed). **Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I.** Berlin: Springer-Verlag,1995, 3-19 p.

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIÈRE, N, Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v.62, p.43-52, 1988.

SHARP, W.R.; SÖNDAHL, M.R.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The physiology of *in vitro* sexaul embryogenesis. **Horticultural Reviews**, v.2, p.268-310, 198O

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases - an organismic perspective. **Pl. Growth Reg.**, v.12, p.303-312, 1993

SIMOLA, L.K. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula* f. *purpurea*. **Scientia Horticulturae**, v.26, p.77-85, 1985.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Principles of instrumental analysis.** 5.ed. USA: Harcourt Brace & Company Publishers, 1998. 288-292p.

STACEY, N.J.; ROBERTS, K.; KNOX, J.P. Patterns of expression of the JIM4 arabino-galactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L.. **Planta,** v.180, p. 285-292, 1990.

STICHER, L.; PENNEL, C.; GREPIN, H. Calcium requirement for the secretion of peroxidases by plant cell suspension. **Journal of Cell Science**, v.48, p.345-353, 1988.

TERMIGNONI, R.R.; WANG-PoJen; Hu-ChingYeh; WANG, P.J.; Hu-CY Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, n.2, p.129-132, 1996.

THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration in tissue culture. **Genetic Engenineering: Applications to Agriculture,** v.1, p.285-302, 1983.

TIBOK, A.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotils of *Eucalyptus urophylla*.**Plant Science-Limerick.**, v.110, n.1, p.139-145, 1995.

TIMMERS, A.C.J.; REISS, H.D.; BOHSUNG, J.; TRAXEL, K.; SCHEL, J.H.N. Localization of calcium during somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). **Protoplasma,** v.190, n.1-2, p.107-118, 1996.

TREWAVAS, A J.; GILROY, S. Signal transduction in plant cells. **Trends in Genetics.**, v.7, p.356-361, 1991.

VAN HUYSTEE, R.B.; XU, Y.; O'DONNELM I. Vsriation in sout band absorptionof peroxidase due to calcium. **Plant Physiol. Biochem.**, v.30, p.293-399, 1992.

VERDUS, M.C.; DUBOIS, T.; DUBOIS, J.; VASSEUR, J. Ultrastructural changes in leaves of *Cichorium* during somatic embryogenesis. **Annals of Botany.**, v.72, n.4, p.375-383, 1993.

WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. Somatic Embryogenesis factors influencing coodinated of cells as in embryogenic group. **Annals of Botany,** v.57, p.443-462, 1986.

WILLIAMSON, R.E. Calcium and the plant cytoskeleton. **Plant Cell Environ.,** v. 7, p. 431-440, 1984.

XU, Y; Van HUYSTEE, R.B. Effect of calcium, its inhibitors and heavy metals on the growth cycle of peanut cell agregates. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** v.32, p.319-328,1993.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal,** v. 57, p.508-515, 1954.

YEO, U.DONG; KOHMURA, H.; NAKAGAWA, N.; SAKURAI, N. Quantitative and qualitative changes of cell wall polysaccharides during somatic embryogenesis and plantlet development of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). **Plant Cell Physiol.** V.39, n.6, p.607-614, 1998.