

» Consultar por: [Base Patentes](#) | [Finalizar Sessão](#)**Depósito de pedido nacional de Patente**

(21) Nº do Pedido: PI9801485-4 A2

[Leia-me antes](#)

(22) Data do Depósito: 10/06/1998

(51) Classificação: [A01H 4/00](#) ; [A01H 5/10](#)

(54) Título: CLONAGEM DE PLANTAS ADULTAS SELECIONADAS DE EUCALYPTUS SSP PELO PROCESSO DE REGENERAÇÃO IN VITRO POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

(57) Resumo: "CLONAGEM DE PLANTAS ADULTAS SELECIONADAS DE EUCALYPTUS SSP PELO PROCESSO DE REGENERAÇÃO IN VITRO POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA". O presente relatório descritivo da patente de invenção refere-se ao desenvolvimento de um processo de clonagem de plantas adultas, valendo-se de material selecionado a partir de Eucalyptus ssp, valendo-se para tal do processo de regeneração "in vitro" por embriogênese somática.

(71) Nome do Depositante: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BR/RS)

(72) Nome do Inventor: Regina Ramos Termignon

(74) Nome do Procurador: RAQUEL SANTOS MAULER

"CLONAGEM DE PLANTAS ADULTAS SELECIONADAS DE *EUCALYPTUS* *ssp* PELO PROCESSO DE REGENERAÇÃO *IN VITRO* POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA"

O presente relatório descritivo da patente de invenção refere-se ao desenvolvimento de um processo de clonagem de plantas adultas, valendo-se de material selecionado a partir de *EUCALYPTUS* *ssp*, valendo-se para tal do processo de regeneração "*in vitro*" por embriogênese somática.

1. METODOLOGIA:

1.1. CULTURA IN VITRO: PREPARO DAS FONTES DE EXPLANTES

A. ASSEPSIA DAS SEMENTES E EXPLANTES:

As sementes são imersas em etanol 70% por um minuto, a seguir retiradas desta solução, transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio a 5% (marca comercial Mazzarollo com 7 a 9 % de Cl ativo) e uma gota de detergente comercial (marca ODD ou similar) mantidas na mesma por 15 minutos, sob agitação constante e suave. A seguir, o material deve ser enxaguado em água destilada estéril, por três vezes no mesmo volume da solução de hipoclorito de sódio utilizada, e inoculadas em meio de cultura para germinação. Para assepsia dos explantes é utilizada a mesma metodologia aplicada para assepsia das sementes, citada acima, porém com uma variação na concentração da solução de hipoclorito de sódio, que passa a ser 0,5%.

B. OBTENÇÃO DE CALOS PRIMÁRIOS FORMADOS NA EXTREMIDADE CORTADA DO EIXO CAULINAR MANTIDA EM CONTATO COM O MEIO DURANTE O PERÍODO DE INCUBAÇÃO:

a. Fontes de explantes com eixo caulinar para a formação do calo primário:

a.1. Explantes nodais com entrenó abaixo da região nodal medindo 0,7 a 1,0

cm de comprimento, mantendo as gemas axilares e/ou meristemas axilares intatos.

a.2. Brotações com 3 a 4 entrenós com até 1,0 cm de comprimento isoladas de plantas desenvolvidas e/ou multiplicadas *in vitro*, apresentado-se na forma normal de desenvolvimento ou com vitrificação em diferentes graus.

5 a.3. Brotações e/ou explantes nodais sem os meristemas ou gemas axilares, que são retirados. Item utilizado como controle para verificação da necessidade do desenvolvimento da gema axilar durante o período de cultura concomitante à formação do calo noduloso da extremidade do eixo caulinar.

b. Preparo dos explantes para inoculação:

10 Os explantes nodais, devem medir, em média, 1,2 cm de comprimento, com 0,5 cm acima do nó e 0,7 cm abaixo do mesmo. Estes segmentos devem ser isolados de ramos de brotação ativa, com 5 a 7 nós, o que corresponde em média a 3 a 4 cm de comprimento dos mesmos dependendo da espécie em questão, uma vez que algumas têm os entrenós mais alongados.

15 Tanto as sementes como os explantes nodais e explantes nodais de brotação de plantas mantidas em micropropagação, após seu isolamento da planta-mãe, são mantidos imersos em água estéril durante sua manipulação na capela de fluxo laminar, e após sua inoculação nos frascos de cultura, passados imediatamente para uma câmara escura, onde permanecem por uma semana a $26 \pm 1^\circ \text{C}$, sendo
20 transferidas após para a luz.

Os explantes que não são oriundos de plântulas germinadas *in vitro*, e que são isolados de plantas matrizes envasadas, devem ser mantidas sob luz direta e difusa, por no mínimo uns quinze dias anteriores à sua utilização, o que estimula um

leve estiolamento das mesmas, com aumento da atividade auxínica endógena e conseqüente alongamento dos entrenós maior do que ocorre nas condições normais de iluminação.

Os explantes nodais ao serem preparados devem ter as folhas maiores de 0.5 cm x 0.3 cm cortadas, no mínimo pela metade ou um terço de seu comprimento, devendo os meristemas ou primórdios de gemas e as próprias gemas axilares ainda não desenvolvidas, serem mantidas intatas nos explantes.

Os explantes de plantas micropropagadas, dependendo das condições *in vitro* em que é provocada a multiplicação das brotações axilares, muitas vezes apresentam-se como um conjunto de ramificações um pouco menos alongadas, mas não necessariamente em 100% das vezes em que são utilizados como fonte de tecidos para indução de calo primário. Em alguns tratamentos durante a multiplicação *in vitro*, estas ramificações apresentam-se vitrificadas (ou com hiperhidria) em diferentes graus.

Todos os cortes feitos nos explantes e no isolamento dos calos primários ou na fragmentação dos mesmos devem ser feito sob água estéril para evitar a sua oxidação.

C. CONDIÇÕES DOS INÓCULOS:

Os calos primários ou derivados da subcultura dos mesmos devem ter sua integridade ou fragmentação natural respeitada, ou no caso de serem compactos ou constituídos de nódulos naturalmente fragmentáveis ou individualizáveis, mantidos como um inóculo único de no mínimo 4 mm³. Os calos podem ser fragmentados, somente naqueles casos em que é possível manter a individualização dos nódulos ou

dos embriões somáticos nas suas diferentes fases do desenvolvimento.

1.2. Condições de cultura utilizadas para a formação do calo primário da base do eixo caulinar

A. Condições físicas:

5 Todas as culturas, a não ser em casos específicos que estarão citados, são desenvolvidas em câmara de cultura climatizada com o uso de aparelhos condicionadores de ar. As condições de iluminação e temperatura ambiente necessárias são: fotoperíodo de 16 horas e $40 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtidos com lâmpadas fluorescentes luz do dia, 20 watts intercaladas com lâmpadas gro-lux também 20
10 watts. A temperatura da câmara, na altura das plantas no interior dos frascos ou acima dos mesmos deve ser de $28 \pm 2^\circ \text{C}$, no período de claro e $26 \pm 1^\circ \text{C}$, no período escuro.

B. Meio de cultura:

 Os meios básicos utilizados nos experimentos de germinação foram meio
15 MS-62 modificado (MS-62Ca/3)/2, Termignoni, R.R. *et al.*, 1996 ou meio (MS-62 Ca/3)/1 (Termignoni, R.R., não publicado).

 Nas culturas primárias assim como nas subculturas das brotações ou dos calos são utilizados os meios: MS-62 modificado (MS-62 Ca/3)/2, meio (MS-62 Ca/3)/1, meio (MS-62)/2 (Murashige & Skoog, 1962), meio RM-65 (Linsmaier & Skoog, 1965)
20 e meio WPM (Mc Cown & Lloyd, 1981).

C. Balanços de reguladores de crescimento utilizados como complemento aos meios básicos acima citados para a formação do calo primário da base do eixo caulinar (Tabela 1 em anexo).

Com estes balanços de reguladores de crescimento obtém-se no final de 30 dias em cultura, calos primários formados na extremidade basal do eixo caulinar destes explantes (extremidade em que foi feito o corte para isolamento do explante da planta-mãe), que é mantida em contato com o meio de cultura durante o período de incubação. Estes calos primários formam-se na extremidade cortada do eixo caulinar mantida em contato com o meio de cultura. São calos compactos ou mais nodulares dependendo das condições de cultura em que se formam (Figura 1 em anexo).

1.2.1. Condições de subcultura do calo primário e obtenção de embriões somáticos.

A. Condições físicas: [Idênticas as citadas em 1.2.]

B. Meios de cultura:

Os meios básicos utilizados nos experimentos de germinação foram: meio MS-62 modificado (MS-62Ca/3)/2, Termignoni, R.R. *et al.*, 1996 ou meio (MS-62 Ca/3)/1 (Termignoni, R.R., não publicado).

Nas culturas primárias assim como nas subculturas das brotações ou dos calos são utilizados os meios: MS-62 modificado (MS-62 Ca/3)/2, meio (MS-62 Ca/3)/1, meio (MS-62)/2 (Murashige & Skoog, 1962), meio RM-65 (Linsmaier & Skoog, 1965) e meio WPM (Mc Cown & Lloyd, 1981).

C. Balanços de reguladores de crescimento utilizados para subcultura dos calos primários (Tabela 2 em anexo).

2. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi completamente casualizado (DCC), tendo

o número de inóculos e/ou explantes por tratamento, variado de 5 a 20, dependendo da disponibilidade do material vegetal em questão. Os experimentos considerados mais significativos foram repetidos mais de duas vezes conforme a necessidade para confirmação.

5 3. Registro de dados

As culturas foram observadas periodicamente, a intervalos quinzenais, semanais ou diariamente, dependendo das variações morfogenéticas apresentadas pelos materiais em experimentação, tendo os resultados sido tabulados e registrados por fotografias. Todas as fotografias foram feitas em microscópio estereoscópio Wild
10 M8 com sistema de fotomicrografia acoplado, marca Leica Wild, modelo MPS 12 ou em máquina fotográfica Nikon modelo 2000.

4. Parâmetros indicativos do potencial embriogenético presente nos calos: caracterização morfogenética

Os calos primários ou derivados da subcultura destes, apresentam uma
15 coloração verde-amarelada clara, com um aspecto noduloso ou com nódulos compactos que apresenta superfície composta de saliências e reentrâncias não muito profundas; a coloração verde-amarelada, com o tempo em cultura tende a escurecer, tornando os calos marrons a marrons-escuros, quase pretos ou totalmente pretos. Os calos derivados da subcultura destes calos primários, em alguns tratamentos tornam-se um
20 tanto vitrificados e apresentam uma superfície lisa e brilhante, com regiões especificamente mais vitrificadas e delimitadas por uma cor verde-escura ou rosada, sendo as vezes vermelhas ou púrpuras arroxadas (cor que indica a presença de antocianinas) (Figuras 2-4), estes nódulos por vezes soltam-se livremente ao serem

5 tocados com a pinça ou durante o desenvolvimento da cultura com o seu crescimento e diferenciação. Na maioria dos tratamentos os calos nodulosos subcultivados tornam-se escuros com o tempo tendendo à cor preta. O aparecimento das estruturas embriogênicas, inicia-se pela presença da massa poliembriogênica de coloração branca brilhante à amarelada clara e brilhante (Figuras 7-8), seguida de embriões individualizados, desde a forma de esfera, coração, passando por torpedos, cotilédones de plantas com radícula ou na forma de vários embriões em desenvolvimento (Figuras 5,6,9-32 em anexo), e ocorre em tecidos de calos velhos, escurecidos, já com mais de 60 dias em cultura, ou em calos oriundos de tecidos de eixos caulinares de brotações que tenham sido subcultivadas várias vezes; nestes a regeneração ocorre nos 10 primeiros dias de cultura.

10 Estes calos ficam escuros e apresentam certa vitrificação em regiões esverdeadas e em alguns casos rosadas, sendo a tonalidade verde bastante forte. Em alguns pontos localizados com esta tonalidade verde forte ocorre a diferenciação de alguns primórdios de embriões, ou mesmo a presença de plântulas já diferenciadas, também vitrificadas (Figuras 29-30 em anexo). Em alguns calos bastante velhos e secos inicia-se o aparecimento de regiões avermelhadas com diferenciação de plântulas e a partir de sua base uma embriogênese secundária (Figuras 14-16). Verificou-se que quanto mais próximo a região nodal fica da superfície do meio de cultura ou mesmo encostando na mesma, os calos formados na extremidade cortada do eixo caulinar tendem a desenvolver esta vitrificação e a diferenciação de plântulas por embriogênese somática diretamente nos calos primários, que, quando regeneram plantas em uma frequência muito elevada (praticamente em

15

20

100% dos casos).

Sempre em mais de 95% dos testes feitos, a partir das regiões verdes vitrificadas aparece a regeneração das plântulas.

Os calos basilares formados a partir de eixos que têm o meristema axilar em contato com a superfície do meio de cultura, mas que não têm contato com o calo deste meristema, tem um potencial de regeneração mais elevado; assim como a cultura de grupo de gemas comparadas a gemas isoladas utilizadas como inóculo (Tabela 3 em anexo), sugerindo um efeito da atividade citocínica desenvolvida nesta região do meristema axilar por ocasião do contato com o meio de cultura, como sendo crítica para a indução do potencial embriogênico nos calos basilares. Foram feitos testes de controle, que serão descritos e que reforçam esta hipótese. Provavelmente o aumento da frequência das divisões celulares que ocorre na região meristemática, aumente a atividade citocínica endógena do sistema, podendo induzir assim o desenvolvimento do potencial embriogênico dos calos formados na extremidade basilar do explante.

A presença de estruturas que caracterizam a embriogênese somática a partir de tecidos de calos basilares formados no eixo, comprova que os tecidos que possuem o potencial embriogênico e que desenvolvem estes embriões somáticos são totalmente oriundos do calo basilar de coloração marrom que não tem conexão histológica, durante sua formação, com os primórdios de gemas pré-formadas e multiplicados nos meristemas axilares de coloração verde (Figura 33 em anexo).

Salienta-se que o potencial embriogênico dos calos expresso pelos parâmetros indicados, manifesta-se de acordo com o histórico de cultura dos tecidos

dos calos em questão e, conseqüentemente, em função dos tratamentos in vitro a que foram submetidos subseqüentemente os tecidos dos calos.

5. Estabelecimento da rotina de desenvolvimento do processo de clonagem de matrizes selecionadas de *Eucalyptus spp.*

5 a. Obtenção do calo primário da base do eixo caulinar de *E. dunnii* e *E. saligna*

Optou-se por utilizar dois balanços de reguladores de crescimento (ANA/BAP):

1. ANA 1 mg/l /BAP 0,02 mg/l e

2. ANA 0,05 mg/l / BAP 0,2 mg/l para indução do calo primário da base do eixo

caulinar.

10 Os calos formados na extremidade seccionada dos explantes nodais e/ou das brotações oriundas de uma a várias subculturas têm a mesma identidade morfológica descrita anteriormente e apresentam um potencial morfogenético que pode ser expresso ao longo do desenvolvimento das diferentes subculturas. São calos nodulosos de coloração inicialmente esverdeada e esbranquiçada que com o tempo em cultura vão tornando-se marrom-escuros a pretos com regiões amareladas e

15 posteriormente avermelhadas e esverdeadas (Tabela 4).

b. Subcultura dos calos primários para obtenção dos embriões somáticos:

As células com expressão da embriogênese somática surgem a partir das regiões escuras e totalmente pretas e de superfície brilhante que mostram a

20 diferenciação no tempo de estruturas caracterizadas na forma de embriões em suas diferentes fases do desenvolvimento (Figuras 5-6 em anexo) e decorrem dos diferentes balanços de reguladores utilizados nas subculturas subseqüentes, os quais estão citados nas tabelas apresentadas.

É possível observar tanto para *E. saligna* (material de sementes e de matrizes envasadas) quanto para *E. dunnii* a diferenciação de radículas e parte aérea, iniciando-se pela formação dos cotilédones e pares de folhas subseqüentes. Em alguns tratamentos a parte aérea dos embriões já diferenciada em folhas apresentam uma coloração rosada (Figuras 30-32 em anexo).

A superfície dos calos embriogênicos apresenta nítida diferenciação dos embriões que evoluem para plantas totalmente desenvolvidas após uma ou mais subculturas subseqüentes.

Observou-se que os calos primários formados no eixo de brotações vitrificadas e/ou no eixo de agrupamentos de brotações normais e/ou vitrificadas derivadas destas plantas embriogênicas desenvolvidas quando subcultivadas com a presença de tecido embriogênico no calo ou mesmo com embriões já diferenciados em plântulas, apresentam uma freqüência de regeneração de embriões somáticos bem mais elevada assim como o aumento do aparecimento da área de regiões de coloração avermelhada e/ou de coloração esverdeada com pontos avermelhados (Tabela 5 em anexo).

A subcultura dos calos primários sem a diferenciação de estruturas embrionárias apresenta, quando cultivados em diferentes balanços de ANA/BAP, diferente potencial de regeneração (Tabelas 3,6 e 7 em anexo).

É possível a individualização das mudas formadas e posterior enraizamento em meio básico, o que ocorre com facilidade para *E. saligna*.

FIGURA 1 - Calo primário noduloso formado na base do eixo caulinar de *Eucalyptus dunnii* desenvolvido em meio RM-65 com 1 mg/l de AIB e 0.05 mg/l de BAP após 30

dias de incubação. Cultura na luz, fotoperíodo de 16 h a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ e $26 \pm 2^\circ$ no período de escuro;

FIGURA 2 - Subcultura de calo primário formado na base das brotações de *Eucalyptus dunnii* desenvolvidas em meio (MS-62 Ca/3)/2 com 0,05 mg/l de ANA e 0,02 mg/l de BAP e/ou 1 mg/l de ANA e 0,2 mg/l de BAP. Calos cultivados em meio (MS-62 Ca/3)/2 com 0,5 mg/l de AIB e 0,05 mg/l de BAP. As condições de iluminação e temperatura são as mesmas citadas na legenda da figura 1;

FIGURA 3 - Subcultura de fragmentos de calo da base do eixo caulinar de *Eucalyptus saligna* formado em meio ((MS-62 Ca/3)/2 com 0,2 mg/l de ANA. Calo embriogênico formado no mesmo meio básico citado na figura 2 com 1 mg/l de ANA e 0,2 mg/l de BAP. Aumento: 6x o tamanho natural;

Figura 4 - Detalhe da massa embriogênica formada no calo da figura acima mostrando a diferenciação de algumas estruturas na fase inicial do desenvolvimento;

FIGURA 5 e 6 - *Eucalyptus saligna*. Diferenciação de plântulas embriogênicas com a formação da parte aérea em coloração branca e rosada e da radícula na base. Cultura do fragmento de calo em meio básico já citado acima na figura 2 com 3 mg/l de ANA e 1 mg/l de BAP. Calo primário formado com 0,1 mg/l de ANA e 1 mg/l de BAP no mesmo meio básico. As condições de iluminação e temperatura são as mesmas citadas na legenda da figura 1;

FIGURA 7 - *Eucalyptus dunnii*. Massa pró-embriogênica formada a partir da subcultura de fragmentos de calos escuros e nodulosos brilhantes sem a presença de estruturas embriogênicas subcultivadas em meio básico citado na figura 2 com 0,05 mg/l de ANA e 0,8 mg/l de BAP. As condições de iluminação e temperatura são as mesmas citadas

na legenda da figura 1. Detalhe da estrutura na forma de torpedo com a coloração verde;

FIGURA 8 - Massa pró-embriogênica branca brilhante formada a partir da subcultura dos calos escuros nodulosos da base do eixo caulinar de *Eucalyptus saligna*. Aumento 16x;

5 FIGURA 9 - Detalhe da diferenciação de embriões a partir da massa pró-embriogênica. Calos de *Eucalyptus dunnii* subcultivados em meio (MS-62 Ca/3)/2 com 0,05 mg/l de ANA e 0,04 mg/l de BAP. Os inóculos desta cultura são calos sem estruturas pré-embriogênicas e derivados da subcultura em 0,05 mg/l de ANA e 0,2 mg/l de BAP. A diferenciação ocorreu a partir de regiões friáveis inicialmente bem verdes que
10 posteriormente transformaram-se em nódulos avermelhados/rosados muito brilhantes. Aumento: 28x;

Figura 10 - *Eucalyptus dunnii*. Diferenciação de estruturas embriogênicas a partir de calos sem estruturas embriogênicas pré-formadas subcultivadas em meio (MS-62 Ca/3)/2 com 0,05 mg/l de ANA e 0,04 mg/l de BAP. Calos derivados da subcultura em
15 1 mg/l de ANA e 0,02 mg/l de BAP;

FIGURAS 11 e 12 - *Eucalyptus dunnii*. Diferenciação de estruturas embriogênicas na forma cotiledonar inicial e mais tardia. Subcultura em meio (MS-62 Ca/3)/2 com 1 mg/l de ANA e 0,02 mg/l de BAP. Inóculos, oriundos de fragmentos de calos formados na subcultura de explantes nodais em meio (MS-62 Ca/3)/2 com 0,05 mg/l de ANA e 0,2 mg/l de BAP.

20 FIGURAS 13 e 14 - *Eucalyptus dunnii*. Diferenciação de embriões com os primeiros pares de folhas e radícula (figura 13) a partir de calos escuros nodulosos subcultivados em meio (MS-62 Ca/3)/2 com 1 mg/l de ANA e 0,02 mg/l de BAP, oriundos de fragmentos de calos formados na subcultura de explantes nodais em meio (MS-62 Ca/3)/2 com

0,05 mg/l de ANA e 0,2 mg/l de BAP;

FIGURAS 15 e 16 - *Eucalyptus dunnii*. Diferenciação de embriões com embriogênese secundária na base (estruturas avermelhadas). Calos subcultivados em meio (MS-Ca/3)/2 em 1 mg/l de ANA/ 0,02mg/l de BAP da subcultura de calos em meio (MS-Ca/3)/2 em 0,05 mg/l de ANA / 0,2 mg/l de BAP.

FIGURAS 17, 18 e 19 - *Eucalyptus dunnii*. Diferenciação de embriões a partir de fragmentos de calos de *Eucalyptus dunnii* subcultivados em meio (MS-Ca/3)/2 e 0,05 mg/l de ANA/ 0,2 mg/l de BAP. Calos derivados de calos primários formados na base do eixo caulinar de brotações cultivadas em meio (MS-Ca/3)/2 em 1 mg/l de ANA/ 0,2 mg/l de BAP. Figura 18, detalhe do desenvolvimento dos cotilédones. Figura 19 detalhe do desenvolvimento das plântulas;

FIGURA 20 e 21 - *Eucalyptus dunnii*. Diferenciação de embriões somáticos a partir de fragmentos de calos de *Eucalyptus dunnii* subcultivados em meio (MS-Ca/3)/2 e 0,05 mg/l de ANA/0,2 mg/l de BAP. Calos derivados de calos friáveis formados na base do eixo caulinar de brotações cultivadas em meio (MS-Ca/3)/2 e 0,02 mg/l de BAP. Figura 21 (outra face do calo). Aumento 6x;

FIGURAS 22, 23 e 24 - *Eucalyptus dunnii*. Detalhes do calo das figuras 21 e 22 em aumentos 9x, 18x e 11x, respectivamente;

FIGURA 25 - *Eucalyptus dunnii*. Diferenciação de embriões somáticos a partir de regiões friáveis brilhantes de coloração verde intenso. Calos subcultivados em meio (MS-Ca/3)/2 com 1 mg/l de ANA/ 0,02 mg/l de BAP, derivados de calos da base de explantes nodais formados em meio (MS-Ca/3)/2 e 0,05 de ANA e 0,2 mg/l de BAP;

FIGURA 26 - *Eucalyptus dunnii*. Calos embriogênicos com diferenciação de plântulas,

formados em meio (MS Ca/3)/2 em 1 mg/l de ANA/ 0,02 mg/l de BAP derivados de calos subcultivados em meio (MS Ca/3)/2 com 1 mg/l de ANA/ 0,02 mg/l de BAP formados na base de brotações;

FIGURA 27 A 30 - *Eucalyptus dunnii*. Calos com regiões verdes friáveis formadas a partir de regiões nodulares escuras apresentando diferentes fases de diferenciação de plântulas embriogênicas formadas em meio (MS Ca/3)/2 com 0,05 mg/l de ANA/ 0,2 mg/l de BAP. Calos formados na base de brotações subcultivadas em meio (MS Ca/3)/2 com 1 mg/l de ANA/ 0,2 mg/l de BAP;

FIGURA 31 - *Eucalyptus dunnii*. Diferenciação de plântulas em meio (MS-62 Ca/3)/2 e 0,05 mg/l de ANA e 0,8 mg/l de BAP a partir de fragmentos de calos subcultivados em meio (MS-62 Ca/3)/2 e 1 mg/l de ANA / 0,02 mg/l de BAP;

FIGURA 32 - *Eucalyptus dunnii*. Aspectos das estruturas formadas em calos subcultivados em meio (MS-62 Ca/3)/2 e 10 mg/l de ANA e 0,02 mg/l de BAP derivados de fragmentos de calos formados em meio (MS-(MS-62 Ca/3)/2 e 1 mg/l de ANA e 0,02 mg/l de BAP e primariamente formado na base de brotações neste meio básico e balanço de reguladores e;

FIGURA 33 - *Eucalyptus dunnii*. Aspecto geral do calo noduloso escuro que se forma na extremidade seccionada do eixo caulinar mantida em contato com o eixo de cultura e do calo friável formado na base da brotação junto ao meristema axilar do explante nodal. O calo noduloso escuro é que serviu como fonte de material vegetal para o estudo desenvolvido e descrito.

P.S. Seguem em anexo tabelas relativas a este pedido, que não puderam ser inseridas no relatório para não haver perda de continuidade.

TABELA 1

BALANÇO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO PARA FORMAÇÃO DO CALO PRIMÁRIO DA BASE DO EIXO CAULINAR

Balanço mg/l/mg/l	nº de repetições/ % de formação do calo primário da base do eixo caulinar	Média μ
ANA / BAP		
1 0,2	100% n=9; 100% n=24; 80% n=30; 50% n=30; 78% n=109; 86,7% n=45; 92% n=25; 100% n=25; 97,9% n=48; 96,8% n=42;	88,14% em 10 experimentos
1 0,02	96,8% n=63; 62,1% n=95; 98,2% n=57; 100% n=33; 100% n=47; 100% n=48; 100% n=90; 100% n=14; 66% n=144; 81% n=57	93,2% em 3 experimentos
1 0,05	96,9% n=32; 100% n=48; 100% n=41; 100% n=27; 34,3% n=35; 100% n=35; 93,5% n=31; 94,1% n=51; 100% n=15; 100% n=15; 59,2% n=27; 100% n=12; 75% n=24; 75% n=4; 67% n=24; 75% n=60; 10% n=56; 100% n=69; 100% n=8; 100% n=60; 88,2% n=17; 100% n=42; 100% n=37	96,05% em 24 experimentos
1 0	65,5% n=29; 44,8% n=29; 73,1% n=26	61,1% em 3 experimentos
0,7 0,1	100% n=51; 98% n=52	99% em 2 experimentos
0,5 0,1	7,1% n=14	
0,05 0,2	62,5% n=24; 78,9% n=19; 70,4% n=27	70,6% em 3 experimentos
AIB / BAP		
1 0,05	100% n=22; 7,3% n=30; 100% n=56; 87,5% n=48	90,2% em 4 experimentos
1 0,005	100% n=24; 100% n=27	100% em 2 experimentos
1 0	81,8% n=11; 84,6% n=13; 100% n=13; 84,2% n=38	87,65% em 4 experimentos
GA ₃ / ANA		
1 1	51,85% n=27	

TABELA 2

BALANÇO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO PARA REGENERAÇÃO DE PLÂNTULAS EMBRIOGÊNICAS A PARTIR DA SUBCULTURA DOS CALOS

Balanço	nº de calos com regeneração/nº de repetições	Média μ
ANA / BAP		
1 0,05	100% n=5; 80% n=5; 86% n=7; 33,3% n=24; 15% n=60; 14,5% n=55; 14,5% n=55; 5,7% n=35; 5,4% n=37; 6,25% n=16; 33,3% n=24; 13,8% n=58; 23% n=13	33,1% em 13 experimentos
1 0,02	9,3% n=182	
1 0,005	4,2% n=24	
2 0,05	23,3% n=19; 21,7% n=23; 20% n=5; 12,5% n=8	20,3% em 4 experimentos
0,7 0,05	88,9% n=9	
MEIO BÁSICO	40% n=15 (RM-65); 4,8% n=83 (MS Ca/3)/2; 20,8% n=24 (MS-62)	21,9% em 3 experimentos
GA ₃ / ANA / KIN		
5 1 0,3	50% n=8	
AIB / BAP		
1 0,05	18,5% n=27; 22,2% n=9; 9,1% n=22; 4% n=75	6,55% em 2 experimentos
2,4 -D		
25	30% n=10	
10	pontos brancos brilhantes n=20	
GA ₃		
5	20% n=10	

TABELA 3

CULTURA *IN VITRO* DE FRAGMENTOS DE CALOS FORMADOS NA BASE DE AGRUPAMENTOS DE GEMAS E GEMAS ISOLADAS (CULTIVADAS EM 50 ANA :1 BAP) EM (MS-62 Ca/3)/2 e ANA/BAP 1:4 e 50:1. Resultados aos 30 dias de cultura.

Balanco	0,05 : 0,2		1 : 0,02	
ANA/BAP [mg/l]				
Tipo de inóculo:	grupos de	gemas	grupos de	gemas
fragmentos de calos formados na base de:	gemas	isoladas	gemas	isoladas
Nº de inóculos	41	29	41	29
Calos com gemas embriogênicas diferenciadas (%)	56	34	25	0
Calos com nódulos escuros (%)	68	62	27	14
Calos com nódulos escuros e regiões esverdeadas (%)	12	21	37	28
Calos com nódulos escuros e esbranquiçados (%)	2	3	10	14
Calos com nódulos esbranquiçados e regiões esverdeadas (%)	8	0	7	8
Calos com nódulos escuros e regiões avermelhadas (%)	8	11	7	8
Calos com nódulos esbranquiçados e regiões avermelhadas (%)	2	0	10	0
Calos com nódulos escuros e regiões esverdeadas e avermelhadas (%)	0	3	2	4
Calos com nódulos escuros, esbranquiçados e regiões avermelhadas (%)	0	0	0	24

TABELA 4

Respostas *in vitro* de explantes nodais de *E.dunnii* cultivados em MS-62 Ca/3/2 complementado com ANA/BAP 0,05:0,2 [mg/l] e 1:0,2 [mg/l], pH 5,6, mantidos em fotoperíodo de 16 hs a uma temperatura de 28 +/- 2°C no período de escuro.

5 Resultados aos 40 e 60 dias de cultura.

Dias em cultura	ANA/BAP	Repetição	Nº de explantes	Multiplicação de gemas (%)	Desenvolvimento de gemas (%)	Nº de expl. com calo na base (%)	Calo Noduloso (%)	Calo friável (%)	Calo Noduloso e friável (%)	Calo compacto (%)	Calo escuro (%)	Calo esverdeado (%)	Calo esbranquiçado (%)	Calo escuro esverdeado (%)	Calo escuro esbranquiçado (%)	Calo escuro avermelhado (%)	Calo escuro amarelado (%)	Calo escuro avermelhado e esverdeado (%)
40	1:4	1	19	42	53	17	82	6	0	12	59	12	5	12	12	0	0	0
40	1:4	2	17	12	76	17	71	29	0	0	70	18	0	6	0	0	0	6
40	1:4	3	20	30	70	18	100	0	0	0	50	0	0	0	50	0	0	0
40	1:4	4	20	35	65	20	100	0	0	0	60	0	0	0	40	0	0	0
40	1:4	média		30	66		88	9	0	3	60	7	1	4	25	0	0	1
40	50:1	1	20	0	80	20	68	32	0	0	90	0	5	0	0	5	0	0
40	50:1	2	19	0	68	19	72	28	0	0	90	0	0	0	5	0	0	5
40	50:1	3	20	0	95	20	90	10	0	0	45	15	0	0	40	0	0	0
40	50:1	4	20	0	75	20	90	10	0	0	50	5	0	0	40	0	0	0
40	50:1	média		0	79		80	20	0	0	69	5	1	1	21	1	0	1
60	1:4	1	19	79	21	18	94	0	6	0	72	0	0	17	11	0	0	0
60	1:4	2	17	47	53	17	76	18	6	0	76	0	0	12	0	0	6	6
60	1:4	3	20	95	5	20	100	0	0	0	65	0	0	30	5	0	0	0
60	1:4	4	20	75	10	20	95	0	5	0	80	0	0	15	5	0	0	0
60	1:4	média		75	22		91	4	4	0	73	0	0	18	5	0	1	1
60	50:1	1	20	0	85	18	94	0	6	0	90	0	0	5	0	5	0	0
60	50:1	2	18	0	89	18	67	22	11	0	90	0	0	5	5	0	0	0
60	50:1	3	20	0	95	20	90	0	10	0	50	0	0	10	40	0	0	0
60	50:1	4	20	0	75	20	95	0	5	0	70	0	0	20	10	0	0	0
60	50:1	média		0	86		86	5	8	0	75	0	0	10	14	1	0	0

TABELA 5

5 Respostas *in vitro* de calos formados na extremidade do eixo de explantes nodais de plantas de *E. dunnii* cultivados em meios RM-65 e WPM complementado com ANA/BAP 1:0,005 [ml/l], pH 5,6, mantidos em fotoperíodo de 16 hs a uma temperatura de 28 +/- 2°C no período de escuro. Resultados aos 25 e 40 dias de cultura.

Dias em cultura	Meio de cultura	Tipo de explantes	N° de inóculos	Desenvolvimento de gemas embriogênicas multiplicados em grupos (%)	Calo esverdeado (%)	Calo escuro (%)	Calo escuro esverdeado (%)	Calo escuro amarelado (%)	Calo esverdeado e esbranquiçado (%)	Calo esverdeado e amarelado (%)	Calo escuro, esverdeado e esbranquiçado (%)	Calo esverdeado e avermelhado (%)
25	RM-65	calo sem gemas embriogênicas	7	0	0	0	0	14	14	58	14	0
25	RM-65	calo com gemas embriogênicas	5	100	20	0	40	0	40	0	0	0
25	WPM	calo sem gemas embriogênicas	5	0	0	0	0	0	0	100	0	0
25	WPM	calo com gemas embriogênicas	4	75	25	0	0	0	0	50	0	25
40	RM-65	calo sem gemas embriogênicas	7	0	43	0	14	0	43	0	0	0
40	RM-65	calo com gemas embriogênicas	5	100	20	60	60	0	0	0	0	0
40	WPM	calo sem gemas embriogênicas	5	0	20	0	20	0	0	0	0	60
40	WPM	calo com gemas embriogênicas	4	75	50	25	0	0	0	0	0	25

TABELA 6

Cultura de calos formados em 0,05:0,2 [mg/l] [1:4] de ANA/BAP e cultivados em MS-62 Ca/3/2 e 1:0,02 [mg/l][50:1] de ANA/BAP pH 5,6, mantidos em fotoperíodo de 16 hs a uma temperatura de 28 +/- 2°C no período de escuro. Resultados aos 90 dias de cultura. Tipo de inóculo: calo sem gemas embriogênicas.

Balanco de Origem: ANA/BAP	Repetição N°	N° de inóculos	Calo com 1 gema (%)	Calo com 1 ou mais gemas (%)	Calo com raízes
1 : 4	1	20	20	0	0
1 : 4	2	16	6	0	6
1 : 4	3	20	0	55	5
1 : 4	4	19	32	37	5
1 : 4	Média		14,5 a	23 a	4 a
50 : 1	1	20	0	0	5
50 : 1	2	10	0	0	10
50 : 1	3	20	15	0	0
50 : 1	4	17	41	0	6
50 : 1	Média		14 a	0 b	5,25 a

Valores seguidos das mesmas letras nas colunas não diferem significativamente ao nível de 5% de acordo com o teste do qui-quadrado.

TABELA 7

5 Subcultura de fragmentos de calos sem gemas embriogênicas formados na base de explantes nodais de *E. dunnii* em MS-62 Ca/3/2 e em diferentes balanços de ANA e BAP, pH 5,6, mantidos em fotoperíodo de 16 hs a uma temperatura de 28 +/- 2°C no período de claro e 26 +/- 2°C no período de escuro. Resultados aos 65 dias de cultura.

ANA/BAP [mg/l]	0:0	0,05:0	1:0	0,05:0,02	1:0,2	1:0,02	0:0,02	0:0,2	0,05:0,2
Diferenciação de gemas embriogênicas (%)*	0	0	0	0	0	0	14	0	14
Calo noduloso escuro (%)*	100	100	100	100	100	86	86	100	100
Calo noduloso escuro com regiões esverdeadas (%)*	0	0	0	0	0	14	14	0	0

* % de 7 explantes

Reivindicações

1- “Clonagem de Plantas Adultas Seleccionadas de *Eucalyptus* spp pelo Processo de Regeneração *In Vitro* por Embriogênese Somática”, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) Seleção dos explantes: obtenção de explantes nodais isolados de plantas com ramos de brotação ativa com 5 a 7 nós, correspondendo a 3 a 4 cm de comprimento, oriundos de plantas matrizes envasadas, mantidas sob luz direta e difusa, por no mínimo uns quinze dias anteriores à sua utilização, e, de plantas desenvolvidas *in vitro*, sendo que os explantes nodais são selecionados dentre:

a.1) explantes nodais com entrenó (meridotalo) abaixo da região nodal medindo 0,7 a 1,0 cm de comprimento, tendo as folhas maiores de 0,5 cm x 0,3 cm cortadas, no mínimo pela metade ou em um terço de seu comprimento, mantendo as gemas axilares e/ou meristemas axilares intactos;

a.2) brotações com 3 a 4 entrenós com cada entrenó medindo até 1,0 cm de comprimento;

b) Assepsia dos explantes: a assepsia dos explantes é feita do seguinte modo: os explantes são imersos em etanol 70% por um minuto, a seguir retirados desta solução, transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e uma gota de detergente comercial, mantidos na mesma por 15 minutos, sob agitação constante e suave; devendo o material ser enxaguado em água destilada estéril, por três vezes no mesmo volume da solução de hipoclorito de sódio utilizada, e inoculados em meio de cultura. Estas operações são executadas na capela de fluxo laminar;

c) Manipulação dos explantes: após seu isolamento da planta-mãe, os explantes, tanto os oriundos das plantas envasadas quanto os oriundos de plantas cultivadas *in vitro*, são mantidos imersos em água estéril durante sua manipulação na capela de fluxo laminar, e após sua

inoculação nos frascos de cultura, passados imediatamente para, sendo a câmara escura, onde permanecem por uma semana a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo então transferidos para a luz;

d) Formação dos calos primários embriogênicos: a formação dos calos primários embriogênicos ocorre na extremidade do eixo caulinar dos explantes, mantida em contato com o meio durante o período de incubação; os meios básicos utilizados são: MS-62, (Murashige & Skoog, 1962) com as seguintes modificações: (MS-62 Ca/3)/2 (Termignoni, R.R. et al. 1996), (MS-62 Ca/3)/1 (Termignoni, R.R. não publicado), RM-65 (Linsmaier & Skoog, 1965) e WPM (Mc Cown & Loyd, 1981); os balanços hormonais utilizados e que resultam na formação de calos embriogênicos são os seguintes: ANA /BAP, nas concentrações 1mg/L/0,2mg/L; 1mg/L/0,02mg/L; 1mg/L/0,05mg/L; 10 1mg/L/0,05mg/L; 1mg/L/0 mg/L; 0,7mg/L /0,1 mg/L; 0,05 mg/L/0,2 mg/L e AIB/BAP, nas concentrações 1mg/L/0,05 mg/L; 1mg/L/0,005 mg/L; 1mg/L/0,0mg/L; os calos formados na base dos explantes, em contato com o meio, têm o aspecto nodular com coloração variando do verde intenso de aspecto vítrificado, ao verde claro-amarelado e/ou esbranquiçado e rosado e/ou totalmente escuros, numa tonalidade que vai do rosa escuro e/ou púrpura, a marrom escuro a 15 quase preto ou totalmente preto, tendo estes escuros, uma superfície muito lisa e brilhante; os calos embriogênicos são constituídos por nódulos naturalmente fragmentáveis ou individualizáveis, não sendo necessário fragmentá-los com auxílio do bisturi ou pinça no momento do sub-cultivo; ao serem tocados com a ponta da pinça, estes calos primários nodulares naturalmente se desagregam em nódulos menores, individualizados; esta é a característica fundamental dos calos embriogênicos aliada às matizes de coloração citadas acima; a coloração 20 muito escura, rosa escura, púrpura, marrom ou preta, e/ou rosada por entre o verde-amarelada-esbranquiçado, é o indicativo da ocorrência do processo embriogênico nestes calos primários;

e) Regeneração das plântulas oriundas de calos embriogênicos: para a regeneração das plântulas embriogênicas, os calos embriogênicos identificados na cultura primária, com as caracterizados do **item d** acima, devem ter a integridade dos fragmentos respeitada, o que ocorre naturalmente ao contato com a pinça; estes devem ter, no mínimo, 4 mm³ para o desenvolvimento do potencial embriogênico e a regeneração das plântulas; a regeneração das plântulas ocorre com a sub-cultura destes fragmentos primários embriogênicos nos meios básicos (MS-62 Ca/3)/2 (Termignoni, R.R. et al. 1996), (MS-62 Ca/3)/1 (Termignoni, R.R. não publicado), RM-65 (Linsmaier & Skoog, 1965) e WPM (Mc Cown & Loyd, 1981) complementados ou não com os balanços hormonais que seguem: ANA/BAP, nas concentrações 1mg/L/0,05mg/L; 1mg/L/0,02mg/L; 10 1mg/L/0,005mg/L; 2mg/L/0,05mg/L; 0,7mg/L/0,05mg/L; 0,05mg/L/0,2mg/L; 0,0mg/L/0,02mg/L; 0,05mg/L/0,0mg/L; 1,0mg/L/0,0mg/L; 1,0mg/L/0,2mg/L; 0,0mg/L/0,02mg/L; 0,0mg/L/0,2mg/L; AIB/BAP, nas concentrações 1mg/L/0,05mg/L e 1,0mg/L/0,0 mg/L; ou somente meio básico sem a presença de hormônios; o aparecimento das plântulas ocorre gradativamente ao longo do dias de incubação, nas diferentes regiões dos calos secundários que vão se formando nas sub-culturas subseqüentes; as estruturas embriogênicas vão se diferenciando, levando à formação de embriões 15 que se individualizam nas suas diferentes fases (esfera, coração, torpedo e cotiledonar); as plântulas que surgem são diminutas e apresentam uma coloração inicialmente rosada; em muitos nódulos observa-se a formação da radícula anterior ao desenvolvimento do restante da plântula; como característica do processo embriogênico tem-se o elevado número de plântulas que surgem 20 na superfície dos calos que se formam a partir destes nódulos sub-cultivados e que apresentam basicamente a coloração escura anteriormente ao aparecimento das plântulas; o aumento na freqüência de regeneração dos embriões somáticos é proporcional ao aumento, nos calos, das regiões de coloração rosada ou das regiões vitrificadas, de um verde intenso, com manchas rosadas, que se tornam muito escuras, anteriormente à formação dos embriões somáticos.