ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DE GEMAS ADVENTÍCIAS DE
Pinus elliottii* ENGELM. var. *elliottii in vitro

AGNALDO SCARASSATI

Engenheiro Florestal

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1996

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

Scarassati, Agnaldo

Análise do desenvolvimento de gemas adventícias de *Pinnus elliottii* Engelm.
var. *elliottii in vitro* / Agnaldo Scarassati. - - Piracicaba, 1996.
79p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
1996.
Bibliografia.

1. Cultura de tecido 2. Propagação *in vitro* 3. Pinheiro - Melhoramento I.
Título

CDD 634.9751

ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DE GEMAS ADVENTÍCIAS DE
Pinus elliottii* ENGELM. var. *elliottii in vitro

AGNALDO SCARASSATI

Aprovada em: 29/11/1996

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves

ESALQ/USP

Prof. Dr. Marcílio de Almeida

ESALQ/USP

Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez

CENA/USP

Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves

Orientador

Aos meus pais Orestes e Ignez pela dedicação na minha formação pessoal.

A minha esposa Erotides pelo apoio nesta caminhada

A minha filha Isabela, alegria dos nossos dias.

Dedico

AGRADECIMENTOS

- À Deus por me ter ajudado a enfrentar as dificuldades com serenidade e otimismo;
- Ao Professor Dr. Antonio Natal Gonçalves pela orientação, amizade e estímulo desde a graduação, fundamentais na execução deste trabalho;
- À Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez e ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida, pelas sugestões e críticas ao Trabalho;
- Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais da E.S.A. “Luiz de Queiroz”, por esta oportunidade de aprimoramento;
- A FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela ajuda concedida através de bolsa de estudo;
- A Duraflora S/A, na pessoa da Bióloga Marina Yukie Murayama, Engenheiro Márcio Pinheiro Ferrari, pelo apoio e fornecimento do material vegetal utilizado neste trabalho;
- Ao técnico de laboratório, José Roberto Romanini, pela amizade e auxílio prestado durante o desenvolvimento deste;

- Aos funcionários do Departamento de Ciências Florestais e do IPEF, que de alguma forma contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho e do curso de mestrado;
- Aos professores, pesquisadores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais.

o autor reconhecidamente

agradece.

“Existem três formas de felicidade: a primeira forma de felicidade é uma vida de prazeres e satisfações; a segunda forma é uma vida como cidadão livre, responsável; a terceira forma é a vida como pesquisador e filósofo.” (Aristóteles)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xvii
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
 2. REVISÃO DE LITERATURA.....	 3
2.1. Cultura de tecidos em <i>Pinus</i>	3
2.2. Uso de antibióticos em meio de cultura.....	22
2.3. Uso de meio de cultura líquido.....	23
 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	 25
3.1. Origem e preparo dos explantes.....	25
3.2. Desenvolvimento dos experimentos.....	28
3.2.1. Parte superior do embrião.....	28
3.2.2. Parte superior dos explantes de <i>seedlings</i> ou plântulas.....	31
3.3. Relação dos experimentos realizados.....	32
 4. ANÁLISE DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 36
4.1. Efeitos dos meios de cultura.....	36
4.2. Efeito das consistências.....	42

4.3. Efeitos das concentrações do regulador de crescimento.....	45
4.4. Efeito da interação meio de cultura e consistência.....	49
4.5. Efeito das interações da concentração do regulador de crescimento e os meios de cultura.....	50
4.6. Efeito da interação da concentração do regulador de crescimento e a consistência dos meios de cultura.....	52
5. CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS.....	64
APÊNDICES.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema do preparo dos meios de cultura utilizados.....	27
Figura 2.	Parte superior do embrião de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , em meio de cultura GD líquido com 0,5 mg/l de BAP.....	69
Figura 3.	Parte superior do embrião de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , com 20 dias em meio de cultura GD-gel sem reguladores de crescimento.....	69
Figura 4.	Parte superior do embrião de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , com 20 dias em meio de cultura GD-gel com 0,5 mg/l de BAP.....	70
Figura 5.	Parte superior de plântulas de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , com 20 dias em meio de cultura GD-gel sem reguladores de crescimento.....	70
Figura 6.	Parte superior de plântulas de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , com 20 dias em meio de cultura GD-gel com 2,5 mg/l de BAP.....	71
Figura 7.	Parte superior de plântulas de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , com 20 dias em meio de cultura GD-gel com 5,0 mg/l de BAP.....	71

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1.	Resumo das principais espécies de <i>Pinus</i> utilizadas em processos de micropropagação, assim como os explantes e autores dos trabalhos.....	16
Tabela 2.	Resumo dos principais autores, objetivos e meios de cultura utilizados para a micropropagação em <i>Pinus</i>	19
Tabela 3.	Resumo da análise de variância para taxa de crescimento relativo, nas fases de indução e alongamento da parte superior do embrião de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliottii</i> , submetidas a quatro diferentes meios de cultura (EE-cotil, GD-cotil, MS-cotil e ZX-cotil), duas consistências (gel e liq) e dois níveis hormonais (0,5 e 1,0 mg/l de BAP) e testemunha (0 mg/l BAP).....	36
Tabela 4.	Valores médios da taxa de crescimento relativo, (TCR ₁ , TCR ₂ e TCR ₃) da parte superior do embrião de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliottii</i> , mantidos em quatro diferentes meios de cultura.....	65
Tabela 5.	Valores médios da taxa de crescimento relativo, nas fases de TCR ₁ , TCR ₂ e TCR ₃ , da parte superior do embrião de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliottii</i> , mantidos em duas consistências (gel e líquida).....	42
Tabela 6.	Valores médios da taxa de crescimento relativo (TCR ₁ , TCR ₂ e TCR ₃), da parte superior do embrião de <i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliottii</i> , submetidos a dois níveis reguladores de crescimento mais a testemunha.....	47

Tabela 7.	Resumo da análise de variância para comprimento (C) e diâmetro (d) da parte superior do embrião de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , aos 30 dias, submetidos a quatro meios de cultura EE-cotil, GD-cotil, MS-cotil e ZX-cotil, nas consistências gel e líquida, com 0 (zero); 0,5; 1,0 mg/l de BAP.....	38
Tabela 8.	Valores médios de comprimento e diâmetro de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , da parte superior do embrião aos 30 dias, na fase de TCR ₁ , submetidos a quatro meios de cultura ZX-cotil, MS-cotil, GD-cotil e EE-cotil.....	65
Tabela 9.	Valores médios de comprimento e diâmetro de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , da parte superior do embrião aos 30 dias, submetidos a dois níveis de reguladores de crescimento e uma testemunha, respectivamente (0; 0,5; 1,0 mg/l de BAP).....	48
Tabela 10.	Valores médios de comprimento e diâmetro de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , da parte superior do embrião aos 30 dias, submetidos a duas consistências (gel e líquida) de meio de cultura.....	43
Tabela 11.	Resumo da análise de variância para tamanho da parte superior do embrião, avaliados aos 60 e 90 dias após a inoculação em meio de cultura (EE-cotil, GD-cotil, MS-cotil e ZX-cotil) e em duas consistências (gel e líquida).....	38
Tabela 12.	Valores médios do comprimento da parte superior do embrião de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> tomados aos 60 dias em quatro diferentes meios de cultura (EE-cotil, MS-cotil, GD-cotil e ZX-cotil).....	65

Tabela 13. Valores médios do comprimento da parte superior do embrião de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> tomados aos 90 dias em quatro diferentes meios de cultura (EE-cotil, MS-cotil, GD-cotil e ZX-cotil).....	66
Tabela 14. Valores médios do comprimento da parte superior do embrião de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> tomados aos 60 e 90 dias em duas consistências de meio de cultura (gel e líquida).....	66
Tabela 15. Resumo da análise de variância para classe de gemas (NG), após o período de 30 dias, e gemas que apresentam tamanho maior que 5 mm (NG > 5) após período de incubação de 15 semanas da parte superior do embrião de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> em três diferentes meios de cultura (EE-cotil, GD-cotil, MS-cotil e ZX-cotil) com duas consistências (gel e líquida), submetidas inicialmente a 0,5 e 1,0 mg/l de BAP.....	39
Tabela 16. Valores médios de NG após 30 dias e NG > 5 de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> após 15 semanas em meio de cultura EE-cotil, MS-cotil, ZX-cotil e GD-cotil.....	66
Tabela 17. Valores médios de NG e NG > 5 de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> após 15 semanas em cultura, originárias de meios com concentração de 0,5 mg/l e 1,0 mg/l de BAP.....	67
Tabela 18. Valores médios de NG após 30 dias e NG > 5 de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> após 15 semanas em consistências gel e líquido.....	43

Tabela 19. Resumo da análise de variância para TCR da parte superior das plântulas ou <i>seedlings</i> de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> considerando-se: taxa de crescimento relativo para avaliações realizadas a cada 30 dias, 4 diferentes meios de cultura, duas consistências (gel e líquida) e dos níveis de reguladores de crescimento (2,5 e 5,0mg/l) e testemunha T (0).....	37
Tabela 20. Valores médios da T.C.R. da parte superior das plântulas ou <i>seedlings</i> de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , em duas consistências de meio de cultura (gel e líquida).....	43
Tabela 21. Valores médios da T.C.R. da parte superior das plântulas ou <i>seedlings</i> . de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , em três diferentes concentrações de hormônios (0; 2,5 e 5,0 mg/l de BAP).....	67
Tabela 22. Valores médios da T.C.R. da parte superior das plântulas ou <i>seedlings</i> . de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , após as fases TCR ₁ , TCR ₂ , TCR ₃ e TCR ₄ , em diferentes meios de cultura.....	67
Tabela 23. Resumo da análise de variância para classes de gemas e gemas maiores que 5 mm, analisadas nas fases (Ind.1) e (Ind.2) e a segunda na fase de alongamento de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> submetido a três meios de cultura em duas consistências e dois níveis hormonais.....	40
Tabela 24. Valores médios para NG da parte superior das plântulas ou <i>seedlings</i> de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , mantidos em quatro diferentes meios de cultura, nas fases de Ind.1 e Ind.2.....	68
Tabela 25. Valores médios para alongamento de gemas (maiores que 5 mm) da parte superior das plântulas ou <i>seedlings</i> de <i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i> mantidos em quatro diferentes meios de cultura.....	68

Tabela 26.	Valores médios para NG de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , mantidos em duas diferentes concentrações (2,5 e 5,0 mg/l de BAP) nas fases de Ind.1 e Ind.2.....	46
Tabela 27.	Valores médios para gemas (maiores que 5 mm) da parte superior de plântulas ou <i>seedlings</i> de <i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i> originários de dois níveis hormonais (2,5 e 5,0 mg/l de BAP) após 15 semanas.....	45
Tabela 28.	Valores médios para NG na parte superior de plântulas ou <i>seedlings</i> de <i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , submetidos a duas consistências de meio de cultura nas fases de Ind.1 e Ind.2.....	44
Tabela 29.	Valores médios para alongamento de gemas (maiores que 5 mm) da parte superior de plântulas ou <i>seedlings</i> de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> mantidos em duas diferentes consistências de meio de cultura.....	44
Quadro 1.	Esquema metodológico usado para parte superior dos <i>seedlings</i> ou plântulas de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , mantidas sob quatro meios de cultura, duas consistências e três níveis de reguladores de crescimento..	34
Quadro 2.	Esquema metodológico usado para parte superior do embrião de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> , mantidos sob diferentes tipos de meios de cultura (EE-cotil, MS-cotil, GD-cotil, ZX-cotil) em diferentes consistências (gel, líquida) e sob várias concentrações de regulador de crescimento....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

2iP: (6-(a,a-dimetilalelamina)purina)
AE: Arnold & Eriksson (1981)
AIB: Ácido Indol Butírico
BAP: 6-Benzilaminopurina
BLG: Meio de cultura de Brown & Lawrence modificado por Amerson et al (1985)
CBM: Meio básico para Cupressus (1985)
DCR: Gupta & Durzan (1985)
EE-A: Meio de cultura Eeuwens (1976) modificado
EE-cotil: Meio de cultura Eeuwens (1976) modificado
EE: Eeuwens, C.J., meio de cultura (1976) modificado
GD-A: Meio de cultura Gresshoff & Doy (1972) modificado
GD-cotil: Meio de cultura Gresshoff & Doy (1972) modificado
GD: Gresshoff & Doy, meio de cultura de (1972)
Kn: Kinetin
LP: Meio de LePoivre (1984) modificado por Aitken & Christie (1989)
LS: Linsmaier & Skoog (1965)
MCM: Meio para micropropagação de coníferas, Bornman (1983)
MS-A: Meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) modificado
MS-cotil: Meio de cultura de Murashige e Skoog modificado
MS: Murashige & Skoog, meio de cultura (1962)
NG > 5 mm: número de gemas maior que 5 mm após 15 semanas de cultura
NG: Classe de gemas
P/V: Peso/Volume
PBS: Meio de cultura "C" de Perez-Bermudez & Sommer (1987)
QP: Quoirin & LePoivre (1977)
SH: Schenk e Hildebrandt, meio de cultura (1972)
TCR: Taxa de crescimento relativo
Zn: Zeatina
ZX-cotil: Meio de cultura ZX

ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DE GEMAS ADVENTÍCIAS DE
***Pinus elliottii* ENGELM. var. *elliottii* in vitro**

Autor: Agnaldo Scarassati

Orientador: Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves

RESUMO

Explantes cotiledonares e epicotilidonares de plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, foram cultivados em três diferentes meios de cultura, Gresshoff & Doy (1972), Murashige & Skoog (1962) e Eeuwens (1976), com duas consistências, gel e líquida, e submetidas a diversas concentrações de BAP para avaliação do crescimento e desenvolvimento.

A análise dos resultados permitiu concluir que para o crescimento e desenvolvimento de explantes cotiledonares, em Taxa de Crescimento Relativo (TCR), os meios de cultura mais adequados foram o Murashige & Skoog (1962) modificado (MS), Eeuwens (1976) modificado (EE) e ZX, na ausência de regulador de crescimento; em comprimento Murashige & Skoog (1962) modificado (MS), ZX e Gresshoff & Doy (1972) modificado (GD) sem regulador de crescimento e consistência líquida; número de gemas, Eeuwens (1976) modificado (EE) e Murashige & Skoog (1962) modificado (MS), e consistência gel; número de gemas maiores que 5 mm, ZX e consistência gel com 0,5 ou 1,0 mg/l de BAP.

Outra conclusão é que para o crescimento e desenvolvimento de explantes epicotiledonares, em TCR (Taxa de Crescimento Relativo), o meio de cultura mais adequado foi ZX, na consistência líquida, e com 2,5 mg/l de BAP; em número de gemas, Eeuwens (1976) modificado (EE) e Murashige & Skoog (1962) modificado (MS); para número de gemas maiores que 5 mm, ZX e consistência líquida com 2,5 ou 5,0 mg/l de BAP.

SHOOT GROWTH AND DEVELOPMENT OF
***Pinus elliottii* ENGELM. var. *elliottii* IN VITRO**

Author: Agnaldo Scarassati

Adviser: Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves

SUMMARY

The aim of this research was to evaluate the growth and development of cotyledonary and epicotyledonary explants of *Pinus elliottii* var. *elliottii* cultivated in three culture different media, Gresshoff & Doy (1972), Murashige & Skoog (1962) and Eeuwens (1976), liquid and gel media supplemented with different BAP concentrations.

The analysis of the results allowed to draw the following conclusions:

- 1 - The relative growth rates of the cotyledonary explants were higher in Murashige & Skoog (1962) modified (MS), Eeuwens (1976) modified (EE) and ZX devoid of BAP;
- 2 - The length growths of the cotyledonary explants were higher in liquid MS modified, ZX and Gresshoff & Doy (1972) modified (GD) devoid of BAP;
- 3 - The number of induced shoots were higher in solid Murashige & Skoog (1962) modified (MS) and Eeuwens (1976) modified (EE) with 0.5 or 1.0 mg/l of BAP;
- 4 - The number of shoots higher than 5 mm were larger in solid ZX with 0.5 or 1.0 mg/l of BAP;
- 5 - The relative growth rates of the epicotyledonary explants were higher in liquid ZX with 2,5 mg/l of BAP;
- 6 - The number of induced shoots were higher in liquid and solid Eeuwens (1976) modified (EE) and Murashige & Skoog (1962) modified (MS) with 2.5 or 5.0 mg/l of BAP.
- 7 - The number of shoots higher than 5 mm were larger in liquid ZX with 0.5 or 1.0 mg/l of BAP.

1. INTRODUÇÃO

Com base nas técnicas desenvolvidas a partir de 1950 para cultura de tecidos e aplicadas na horticultura e outras plantas agrícolas, alguns pesquisadores realizaram programas similares para árvores, visando o plantio comercial de florestas clonais. Isto implicou em avanços no conhecimento da fisiologia do processo em laboratório e estudos mais adequados dos fatores que o influenciam (Durzan, 1985).

A cultura de tecidos é uma técnica na qual pequenos pedaços ou órgãos são removidos das plantas sem que se pretenda causar danos, colocados em meio asséptico com nutrientes e reguladores vegetais. A manipulação da composição química do meio de cultura e de outras variáveis envolvidas, o crescimento e desenvolvimento deste explante são direcionados dependendo do resultado esperado (Bonga, 1985).

Muitas gimnospermas são propagadas sexualmente através de sementes. Este método preserva apenas algumas características desejáveis. Por outro lado, a propagação assexuada, aqui incluindo a cultura de tecidos, permite a perpetuação de características, selecionando-se os melhores indivíduos e garantindo a continuidade genética (David, 1985).

Capuana (1994) observou que os estudos realizados com *Pinus* spp. desde 1975, objetivaram aperfeiçoar técnicas de micropropagação, embriogênese somática, cultura de protoplasto e transformações genéticas. Sendo esta última técnica o objetivo

atual dos pesquisadores em todo o mundo, como potente instrumento no melhoramento genético.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e o desenvolvimento de explantes cotiledonares e epicotiledonares de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, cultivados em quatro meios de cultura, Murashige & Skoog (1962) modificado (MS), Eeuwens (1976) modificado (EE), Gresshoff & Doy (1972) modificado (GD) e ZX, líquidos e sólidos, com diferentes concentrações de BAP e suas interações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura de tecidos em *Pinus*

Segundo Sharp (1991), nos anos 50 a cultura de tecidos teve maior relevância com a publicação de "The Handbook of Plant Tissue Culture", de White¹ e "The Culture of Plant Tissues" de Gautheret². Sendo que Skoog & Miller³ demonstraram a importância das citocininas e auxinas no meio de cultura para o controle da organogênese. Em 1962, Murashige & Skoog⁴ descreveram um meio de cultura para rápido crescimento de biomassa utilizando cultura de tecido em tabaco.

Trabalhos de cultura de tecidos em *Pinus* spp podem ser citados, à partir de 1982, conforme Tabela 1.

Na década de 80 foram publicados vários estudos referentes ao *Pinus*, sendo que, dos trabalhos revistos, a maior ênfase está entre 1985 e 1989.

No trabalho de Sommer et al. (1975), foram utilizados 2,0 mg/l de ANA e com 5,0 ou 2,0 mg/l de BAP, para indução de gemas adventícias em embriões zigóticos de *Pinus palustris* Mill, obtendo maior produção a 5mg/l de BAP em 80% dos explantes,

¹ WHITE PHILIP - A handbook of Plant Cell Culture. The Jacques Catell Press, Inc., Tempe, Arizona, 1943.

² GAUTHERIT, R. - The Culture of Plant Tissues. Paris: Masson et Cie, 1959.

³ SKOOG, F. e MILLER, C. - Symp. Soc. Exp. Biol., v. 9: p.118-31, 1956.

⁴ MURASHIGE, T. e SKOOG, F. - Physiol. Plant, v. 15: p.473-97, 1962.

após o período de quatro semanas em cultura. Entre 10 a 21 dias, muito cotilédones haviam cessado o seu crescimento, atingindo entre 1 a 2cm de comprimento. Para o processo de alongamento, os explantes foram tranferidos para meio sem regulador de crescimento e sem a presença de amônia, em concentrações reduzidas de sais.

Yeung et al. (1981) utilizaram $2,22 \times 10^{-5}$ M (5,0 mg/l) de BAP por 3 a 4 semanas na indução de gemas adventícias em *Pinus radiata* D. Don. Após o período de 10 dias, verificou-se o tamanho dos explantes, obtendo-se 0,3 cm de comprimento na presença de BAP e 2,3 cm de comprimento na sua ausência.

Horgan & Aitken (1981) trabalharam com 5 mg/l de BAP durante três semanas, em meio líquido SH sob agitação, para a indução de gemas adventíceas em embriões e *seedlings* de *Pinus radiata* D. DON, tranferindo-os para meio sólido SH sem regulador de crescimento e posteriormente para GD modificado, na presença de citocinina, observando que tal procedimento aumentava a capacidade de formação de raízes.

David et al. (1982) utilizaram 0,8; 1,5; 5,0 e 10 μ M de BAP, conjuntamente com 5, 10 e 50 nM de ANA, na fase de indução de gemas adventícias em *seedlings* de dez dias de *Pinus pinaster* Ait., obtendo maior quantidade de gemas adventícias com 0,8 μ M (0,18 mg/l) de BAP e 5nM de ANA.

No trabalho de Bionde & Thorpe (1982), cotilédones de *Pinus radiata* com 3 a 5 mm de comprimento receberam várias concentrações de BAP para indução de gemas adventícias, sendo que o melhor resultado foi obtido a 5×10^{-5} M, durante período de cultivo de 3 semanas, em meio SH.

Rancillac et al. (1982), no estudo de enraizamento de gemas axilares de *Pinus pinaster*, aceleraram o processo de alongamento destas, utilizando 2×10^{-5} M de BAP e 5×10^{-8} M de ANA, durante o período de 30 dias.

Em estudo sobre as potencialidades da cultura de tecidos em espécies florestais, Villalobos et al. (1983) indicaram que se pode conseguir induzir gemas adventícias em cotilédones de *Pinus radiata*, após três semanas de cultivo em meios MS e SH com 0,5 e 3,0 μ M de citocininas, sendo que a presença de 0,05 a 0,5 μ M de auxinas pode auxiliar no processo. Em outro trabalho, Villalobos et al (1984) utilizaram cotilédones de 3 a 5mm de comprimento, colocados horizontalmente em placa de petri, em meio de cultura SH modificado po Reilly & Washer (1977), citado pelo autor, com 25 μ M de BAP e em outro teste utilizou-se o mesmo protocolo, porém no meio de cultura não foi utilizado regulador de crescimento. O resultado foi que, após 5 dias, o material em meio de cultura livre de regulador apresentou maior crescimento em comprimento em relação ao material colocado em SH com regulador de crescimento, sendo que nesse último caso, não ocorreu indução de gemas adventícias.

Patel & Thorpe (1984) utilizaram cotilédones excisados de 5 a 7 dias de idade para indução de gemas adventícias com 25 μ M de BAP, obtendo primórdios de gemas após 21 dias de cultivo. Em outro teste, sem a presença do regulador de crescimento, houve alongamento do explante, sem que se apresentasse sinais de meristemóides.

Abdullah et al. (1985), trabalhando com a indução de gemas adventícias em embriões excisados de *Pinus brutia* Ten., utilizaram combinação de 1, 3, 5 e 7 mg/l de

BAP com 0,01 mg/l de ANA, durante período de seis semanas, obtendo os melhores resultados para indução de gemas adventícias com 3mg/l de BAP em meio de cultura SH, seguindo-se, com as mesmas dosagens de citocininas os meios de cultura GD e LS, nesta ordem. Após o período de indução, os explantes foram mantidos em meio de cultura SH e GD sem regulador de crescimento, observando-se, após 24 semanas, que o material originário de concentrações de 1 e 3mg/l de BAP produziram gemas que obtiveram tamanho superior a 10mm.

Christie et al. (1985) em estudos sobre a influência da idade de explantes na capacidade de produzir gemas adventícias, quando induzidas com regulador de crescimento, observaram que os explantes mais jovens possuem maior habilidade para apresentar gemas, sendo que a maior presença de lipídeos e proteínas, a menor complexidade estomatal, assim como o menor espessamento da parede celular, foram fatos indicados pelos autores como principais para esta habilidade. Outros autores como Bionde & Thorpe⁵, Douglas et al.⁶, Patel & Berlyn⁷ citados por Christie et al. (1985) estudaram as ocorrências deste processo, chegando as mesmas conclusões, que quanto mais jovem o explante, maior a sua habilidade de diferenciação.

Bermúdez & Sommer (1987) utilizaram variações de BAP (2,2; 4,4 e 22 μ M) e ANA (0,005 e 0,05 μ M) em meios de cultura diferentes, para a indução de gemas adventícias em embriões zigóticos de *Pinus elliottii* transferidos para meio de cultura sem

⁵ BIONDI, S.; THORPE, T.A. Growth regulator effects, metabolite change, and respiration during shoot initiation in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata*. **Botanical Gazette**, n.143, p.20-25, 1982.

⁶ DOUGLAS, T.J.; VILLALOBOS, V.M.; THOMPSON, M.R.; THORPE, T.A. Lipid and pigment changes during shoot initiation in cultured explants of *Pinus radiata*. **Physiologia Plantarum**, n.55, p.470-477, 1982.

⁷ PATEL, K.R.; BERLYN, G.P. Cytochemical investigations on multiple bud formation in tissue cultures of *Pinus coulteri*. **Canadian Journal of Botany**, n.61, p.575-585, 1983.

a presença de reguladores de crescimento e sub-cultivados, durante o período de 15 semanas. Os resultados obtidos demonstraram que a exposição dos explantes durante 5 dias em meio líquido a 22 μ M de BAP possibilitou maior porcentagem de indução de gemas adventícias, seguidas, pela ordem, das concentrações de 22 μ M de BAP, durante 20 dias, em meio líquido, 10 dias de exposição a 22 μ M de BAP em meio líquido e 30 dias de exposição a 22 μ M de BAP em meio sólido. Durante o processo posterior de alongamento, porém, os explantes mantidos em níveis mais baixos do regulador BAP (2,2 e 4,4 μ M) apresentaram maior capacidade de alongamento das gemas induzidas. Outras constatações foram que, nos meios onde o NH_4^+ foi omitido e apenas ocorria a presença de NO_3^- a 8,8mM, ocorreu aumento no número de gemas adventícias por embrião. O trabalho também apresenta resultado demonstrando que em meio de cultura com 4,4 μ M de BAP, sem a presença de amônia, dobrou-se o número de gemas adventícias, verificando-se haver correlação entre o tipo de meio de cultura utilizado (concentração de sais) e a quantidade de BAP adicionada.

Na micropropagação de *Pinus mugo* Turra var. *mugo*, Mudge (1986) utilizou embrião zigótico e *seedlings* de quatro meses de idade, em meio de cultura GD com várias concentrações de BAP, obtendo os melhores resultados, em embriões zigóticos, após 6 semanas de cultura, com 22 μ M. Para *seedlings*, a quantidade requerida foi de 111 μ M de BAP.

Para a regeneração de explantes hipocótilo-cotiledonar de *Pinus strobus* L., Kaul (1987) utilizou na fase de indução 0,2 mg/l de ANA e 2 mg/l de BAP durante 2 a 3 semanas. Posteriormente os explantes foram subcultivados por mais 6 a 8 semanas em

meio de cultura sem regulador, com média em torno de 14,7 gemas, de 3 a 7 mm comprimento por cultura.

Abdullah & Grace (1987), trabalhando com *Pinus brutia* Ten., utilizaram 5 e 10 mg/l de BAP para indução de gemas adventícias em acículas de *seedlings* de 1, 3, 6 e 12 meses de idade durante o período de 20 a 30 dias. Em outro experimento, dos mesmos autores, foi utilizado o sistema de *pulsing* com aplicações de altas concentrações de BAP (50, 100, 200 e 400 mg/l) durante duas horas e desenvolvimento em meio de cultura livre de hormônio durante 4 semanas, em acículas retiradas de *seedlings* com 8 anos de idade. Os resultados demonstraram que *pulses* de 50mg/l de BAP foram mais eficientes para indução de gemas adventícias, e que materiais mais jovens, *seedlings* com 1 mês de idade, fornecem acículas com maior capacidade de formação de gemas.

Verificando o comportamento de embriões colocados em meio de cultura na presença de 22μM de BAP, Ellis & Judd (1987), descreveram que a parte do explante em contato com o meio apresentava formação de gemas adventícias, enquanto a outra parte, apenas alongava. Este fato, segundo os autores, parece estar relacionado com o BAP, que permitiria síntese rápida de proteínas, desencadeando processo acelerado de multiplicação celular, via estímulo na produção de RUBP (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase)

Bronson & Dixon (1988) utilizaram 10 mg/l de BAP e 0,01 mg/l de ANA, para indução de gemas adventícias em *Pinus elliottii* Engelm., durante período de quatro semanas, após o qual foram transferidos para meio sem regulador de crescimento.

Oito semanas desde o início do processo, os explantes apresentavam de 5 a 10mm de comprimento, com média de 51,2 gemas por embrião e 7 a 8 gemas por cotilédones.

No estudo da morfologia e histologia do processo de indução de gemas adventícias em cotilédones de *Pinus pinaster*, Tranvan et al. (1988) utilizaram 5×10^{-7} mol dm^{-3} de BAP, com 5×10^{-8} mol dm^{-3} de AIB, durante 28 dias. Em outro experimento do mesmo trabalho, o meio de cultura estava sem regulador de crescimento e observou-se que os explantes apenas cresceram em comprimento.

Webb et al. (1988) verificaram a eficácia de vários tipos de citocininas no processo de indução de gemas em cotilédones, epicótilo e hipocótilo, originários de embriões e *seedlings* de *Pinus strobus* L., assim como as concentrações mais adequadas e a influência da idade dos explantes para o processo. Os cotilédones excisados de embriões obtiveram maior número de gemas adventícias com 5,0 mg/l de BAP, sendo que este estava com 5 dias de germinação. Resultado idêntico foi obtido para aquele cotilédon que possuíam 7 dias de germinação. Outro experimento observou que para períodos de indução em cotilédones de duas semanas, o maior número foi obtido com 5,0 mg/l de BAP, enquanto para um período de indução de quatro semanas, o ideal seria o uso de 1,0mg/l de BAP. Em relação a porção do epicótilo em *seedlings*, necessita-se de 1,0 mg/l de BAP para induzir maior quantidade de gemas adventícias, enquanto o hipocótilo apical necessita de 10,0 mg/l e o hipocótilo basal necessita de 25,0mg/l de BAP.

Trabalhando com *Pinus elliottii*, Lesney et al. (1988) induziram gemas adventícias em cotilédones, com adição de 10 mg/l de BAP e 0,01 mg/l de ANA, no meio de cultura por um período de seis a oito semanas.

Thorpe (1988) trabalhando com cotilédones constatou que níveis acima de 50 μ M de BAP inibiam a indução de gemas em *Pinus radiata* e que, níveis abaixo de 5 μ M reduziam em muito o processo, preferindo trabalhar com 25 μ M de BAP durante o período de 21 dias. Estabelecida a curva de crescimento relativo ao tamanho, observou-se que no 21º dia de cultura os explantes sem a presença de BAP atingiram 2,4 cm e com BAP, 0,6 cm. Em relação ao peso fresco, no 14º dia, os explantes com BAP pesavam 8,0mg e sem a presença deste regulador de crescimento 14mg.

Trabalhando com *seedlings* de diversas idades em *Pinus sylvestris*, Zel et al. (1988) observaram pouca influência deste fator no desenvolvimento de gemas apicais. Doses crescentes de BAP (1,5,10 e 50 μ M) indicaram que a 50 μ M de BAP houve maior desenvolvimento. Em relação as mesmas variáveis, idade dos *seedlings* e doses de BAP, observou-se que para o alongamento de gemas axilares, o melhor resultado foi obtido com *seedlings* de nove e três semanas de idade e doses de 50 μ M de BAP, por 30 dias. Neste período, pode-se constatar o aparecimento de gemas axilares alongadas de até 15mm, em concentrações de 1 μ m de BAP.

Schwarz et al. (1988) trabalharam com várias concentrações de BAP (50, 10, 2, 0,2, 0,02 μ M) em *Pinus strobus*, para indução de gemas em cotilédones, obtendo após período de 21 dias, respectivamente: 14, 15, 10,6 e 2 gemas por explantes, com 50 μ M, 10 μ M, 2 μ M, 0,2 μ M e 0,02 μ M de BAP. Estatisticamente ($p = 0,05$), os melhores resultados foram obtidos a 50, 10 e 2 μ M de BAP. Após este período, os explantes foram colocados em meio de cultura sem regulador de crescimento, obtendo-se

9,97; 10,6 e 12,6 gemas por explante, respectivamente com 50 μ M; 10 μ M e 2 μ M de BAP na fase de indução, depois de 21 semanas de cultivo. Segundo os autores, os primeiros resultados diferem de outros encontrados em literatura. Kaul⁸ e Flinn⁹ conseguiram respectivamente induzir 14,7 e 44 gemas por explantes. Isto, segundo o autor, deve-se a diferentes meios de cultura utilizados, posição do explante no meio e/ou fatores genotípicos.

Skidmore et al. (1988), ao trabalharem com meio de cultura líquido, utilizaram 20 μ g/ml de BAP durante 21 dias para indução de gemas adventícias em embrião zigótico de *Pinus caribaea* Morelet.

Pulido et al. (1990) determinaram que sementes germinadas por três dias em meio contendo 10⁻⁵ M de BAP por 2 a 3 semanas, apresentaram maior número de gemas em cotilédones (14,6 por explante) de *Pinus canariensi* Sweet ex K. Spreng. e que esta combinação permitiu maior número de gemas alongadas (2,94 gemas) após 15 semanas de cultivo.

Ao trabalhar com cotilédones de 3 a 5mm de *Pinus radiata* D. Don, Thorpe (1990) utilizou concentração de 25 μ M (5,63 mg/l) de BAP durante período de 21 dias. Outro teste sem a presença do regulador de crescimento apresentou crescimento do explante (24mm), porém sem a existência de gemas adventícias após 21 dias de cultivo.

Em trabalho realizado por Burns et al. (1991) para indução e alongamento de gemas adventícias e alongamento de gemas axilares em *seedlings* de 30 a 40 dias de *Pinus elliottii* Engelm, obteve-se resultados indicando que há interação entre o

⁸ KAUL, K. *Plant Cell Reports*, v.6, p.5-7, 1987.

⁹ FLINN, B.S.; WEBB, D.T.; GEORGIS, W. *Canadian Journal of Botany*, v.64, p.1948-1956, 1986.

meio de cultura (MS, GD e PBS) e a concentração de BAP. Os melhores resultados foram obtidos, para número de gemas por explante, em 111 $\mu\text{M/l}$ de BAP, sendo mais adequado o meio de cultura MS e PBS. Sem a presença de reguladores de crescimento, o meio GD é o mais adequado, seguindo-se o MS e PBS. Para análise dos avanços conseguidos em relação ao tamanho das gemas, os autores utilizaram a separação por classes, sendo:

a- menores que 2mm

b- entre 2mm e 1cm

c- entre 1cm e 2cm

d- maiores que 2cm

Os resultados mostraram que na fase de indução são necessários no meio de cultura GD, 22,2 $\mu\text{M/l}$, 111 $\mu\text{M/l}$ ou 222 $\mu\text{M/l}$ de BAP e para o meio de cultura PBS, 111 $\mu\text{M/l}$ ou 222 $\mu\text{M/l}$ de BAP para que na fase de alongamento ocorram melhores resultados com gemas da classe b.

Chesick et al. (1991) pesquisaram a melhor combinação entre concentrações de BAP e meios de cultura em cotilédones de *Pinus strobus* L., chegaram a conclusão que 20 μM de BAP acrescido ao meio de cultura de Lepoivre modificado por Aitken-Christie (1984) induzia o maior número de gemas adventícias. Foram também testados os meios de cultura modificado de SH, MS e GD a concentrações de 1, 5, 10, 29 e 50 μM de BAP.

Saravitz et al. (1991) conseguiram induzir maior número de gemas adventícias em cotilédones de *Pinus virginiana* Mill com concentração de 10 mg/l de

BAP durante um período de 4 semanas de cultura, com média de 42 gemas adventícias por explante. As concentrações testadas foram de 0,5 a 1,0mg/l de BAP e o meio de cultura utilizado para indução foi o de BLG, modificado por Amerson et al. (1985), sendo que para alongamento das mesmas, os meios de cultura utilizados foram o GD com modificações feitas por Mott & Amerson (1981).

Chang et al. (1991) testaram combinações de concentração de citocininas (BAP, zeatina, 2 iP e Kinetin) com ANA em diversas concentrações para a fase de indução de gemas em cotilédones de *Pinus virginiana* Mill., obtendo os melhores resultados com BAP a 22,2 μ M (5,0mg/l) e 11,1 μ M (2,5mg/l) em combinação com 0,05 μ M de ANA. Da mesma forma, Lambardi et al. (1991) trabalharam com *Pinus halepensis* Mill. com várias citocininas (BAP, Kinetin, Zeatina e 2 iP), obtendo os melhores resultados com BAP a 5,0 μ M (1,13 mg/l), para indução de gemas adventícias em cotilédones, após 3 semanas de cultura. A média neste experimento foi de 22,5 gemas por explante.

Peralta & Sanchez (1991) utilizaram concentrações de 0,1; 2,2; 2,5; 3,0; 5,6 e 7,0 mg/l de BAP de 8 a 12 semanas, incluindo o período de alongamento, sem a presença de reguladores vegetais, obtendo melhores resultados a 3,0 mg/l de BAP.

Jang & Tainter (1991) trabalharam no processo de indução de gemas adventícias em cotilédones de *Pinus echinata* Mill, *Pinus virginiana* Mill e híbridos de *Pinus echinata* Mill com *Pinus taeda* L., com concentrações de 10mg/l de BAP e 0,01mg/l de ANA, em meio de cultura GD, durante período de 4 a 6 semanas. As gemas adventícias

produzidas foram separadas e inoculadas em meio de cultura sem regulador de crescimento, obtendo comprimento de 2 a 3cm, após período de 8 a 12 semanas.

Pulido et al. (1992) avaliaram em embriões seccionados de megagametófito de *Pinus canariensis* a influência do tempo de exposição ao regulador de crescimento BAP na concentração de 100 μ M na formação de gemas adventícias. O índice para verificação dos avanços foi idealizado pelos autores e denominado de BFC (“bud forming capacity”). O tempo de exposição variou de 1, 10, 15, 20, 25 e 30 min. a 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 16 horas, assim como, os explantes utilizados possuíam tempos de germinação (“day 0 e day 3”) antes de serem utilizados no processo. Em relação a exposição de minutos, o maior número de gemas induzidas após 8 semanas, foi com 25 min. (7,8 gemas por explante). Em relação a exposição a horas, os melhores resultados para tempo de germinação zero foram com 16 horas em regulador de crescimento (11,9 gemas por cotilédones), após 8 semanas e com 6 horas, (10,3 gemas por cotilédone). Em relação a explantes com tempo de germinação de 3 dias, os melhores resultados foram com 6 horas de exposição (12,8 gemas por cotilédones), após 8 semanas de cultivo. Utilizando meio gelatinoso, o melhor resultado foi obtido com 14 dias em meio para indução (13,4 gemas por cotilédones), resultado comparável a *pulsing* de 24 min., (14,1 gemas por cotilédones) após 8 semanas.

Em outro trabalho realizado por Pulido (1992) em estudo do explante mais adequado na micropropagação do *Pinus canariensis*, a partir de secções do megagametófito, utilizou o meio de cultura para coníferas descrito por Bornmam (1983). Este autor observou que à concentração de 5×10^{-5} M de BAP, houve indução de 24,5 gemas por cotilédone, após 8 semanas de cultivo, enquanto após 12 a 16 semanas, o

número maior de gemas com 5mm de comprimento, foi obtido usando-se 5×10^{-6} M de BAP durante 8 semanas, com 21,5 por cento de gemas, nos 12 a 15 cotilédones inoculados.

Halos & Go (1993) obtiveram resultados satisfatórios trabalhando com 8,9 μ M (2,0mg/l) e 22,2 μ M (5,0mg/l) BAP, com *Pinus caribaea* Morelet, dentro de uma combinação de 8,9; 22,2; 44,4 e 66,7 μ M, durante período de uma semana. Estes resultados a 22,2 μ M e 8,9 μ M de BAP, induziram $8 \pm 0,4$ gemas adventícias por embrião, após 15 semanas, contando com as 3 semanas no meio indutor.

Segundo Go et al.(1993), a 22,2 μ M de BAP, durante período de exposição de duas semanas, obteve-se os melhores resultados na indução de gemas (5,1 a 6,7) em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, de quatro origens diferentes.

Férriz et al. (1994) trabalharam com *Pinus pinea* L. identificando que o meio de cultura MS, quando comparado com os meios GD e SH, necessitava de concentrações menores de BAP para indução de gemas adventícias em cotilédones. Com 5 μ M (1,12mg/l) de BAP, os meios de cultura GD e SH foram os mais adequados; a 25 μ M não houve diferença significativa. Entre os meios acrescidos de 50 μ M (5,63mg/l) de BAP, SH e GD foram iguais na resposta, sendo o meio de cultura MS inadequado para indução de gemas adventícias nas quantidades verificadas de reguladores de crescimento.

Pulido et al. (1994) observaram que concentrações de 10 μ M de BAP induziram 15,3 gemas por cotilédones após 4 semanas e 25% de gemas maiores que 5mm após 16 semanas. Para este teste, utilizou meio MCM com sais modificados por Pulido et al. (1990) e explantes cotiledonares de *Pinus canariensis* com três dias de germinação.

Tabela 1 - Resumo das principais espécies de *Pinus* utilizadas em processos de micropropagação, assim como os explantes e autores dos trabalhos.

AUTORES	EXPLANTES	ESPÉCIE
Férriz et al. (1994)	cotilédones	<i>Pinus pinea</i>
Pulido et al. (1994)	cotilédones	<i>P.canariensis</i>
Harry & Thorpe (1994)	embrião zigótico	<i>P.banksiana</i> Lamb.
Mazari & Camm (1993)	cotilédones	<i>P.ponderosa</i> Dougl.
Go et al. (1993)	cotilédones	<i>P.caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i>
Halos & Go (1993)	cotilédones e embrião zigótico	<i>P.caribaea</i> Morelet
Pulido et al. (1992)	megagametófilo	<i>P.canariens</i>
Lambardi et al. (1991)	cotilédones	<i>P.halepensis</i> Mill.
Peralta & Sanchez (1991)	Embrião zigótico	<i>P.durangensis</i> Mart. <i>P. greggii</i> Engelm.
Chang et al. (1991)	cotilédones	<i>P.virginiana</i> Mill.
Jang & Tainter (1991)	cotilédones	<i>P.echinata</i> Mill; <i>P.taeda</i> L. com híbrido de <i>P.echinata</i> Mill. <i>P.virginiana</i> Mill.
Saravitz et al. (1991)	cotilédones	<i>P.virginiana</i> Mill.
Burns et al. (1991)	<i>seedlings</i>	<i>P.elliottii</i> Engelm.
Chesick et al. (1991)	cotilédones	<i>P.strobus</i> L.
Bergmann & Stomp (1991)	cotilédones	Nove espécies de <i>Pinus</i>
Thorpe (1990)	cotilédones	<i>P.radiata</i>
Pulido et al. (1990)	cotilédones e embrião zigótico	<i>P.canariensis</i>
Lesney (1989)	acículas	<i>P.elliottii</i> Engelm.

Tabela 1 - Continuação.

AUTORES	EXPLANTES	ESPÉCIE
Abdullah et al. (1989)	<i>seedlings</i>	<i>P.brutia</i> Ten.
Jain et al. (1989)	cotilédones e embrião zigótico	<i>P.elliottii</i> Engelm.
Kumar et al. (1988)	cotilédones	<i>P.radiata</i>
Thorpe (1988)	cotilédones	<i>P.radiata</i>
Skidmore et al. (1988)	embrião zigótico	<i>P.caribaea</i> Morelet.
Zel et al. (1988)	<i>seedlings</i>	<i>P.sylvestris</i>
Schwarz et al. (1988)	cotilédones	<i>P.strobus</i> L.
Lesney et al. (1988)	cotilédones	<i>P.elliottii</i>
Webb et al. (1988)	cotilédones e <i>seedlings</i>	<i>P.strobus</i> L.
Tranvan et al. (1988)	cotilédones	<i>P.pinaster</i>
Bronson & Dixon (1988)	cotilédones e embrião zigótico	<i>P.elliottii</i> Engelm.
Grönroos & von Arnold (1987)	<i>seedlings</i>	<i>P.sylvestris</i> L.
Abdullah & Grace (1987)	<i>seedlings</i>	<i>P.brutia</i> Ten.
Kaul (1987)	hipocótilos cotilédones	<i>P.strobus</i> L.
Mudge (1986)	embrião zigótico <i>seedlings</i>	<i>P.mugo</i> Turra var. <i>mugo</i>
Christie et al. (1985)	cotilédones	<i>P.radiata</i>
Abdullah et al. (1985)	cotilédones e embrião zigótico	<i>P.brutia</i> Ten.
Mckeand & ALLEN (1984)	cotilédones	<i>P.brutia</i> Ten.
Patel & Thorpe (1984)	cotilédones embrião zigótico	<i>P.radiata</i>

Tabela 1 - Continuação..

AUTORES	EXPLANTES	ESPÉCIE
Villalobos et al. (1984)	cotilédones	<i>P.radiata</i> D. Don.
Villalobos et al. (1983)	cotilédones	<i>P.radiata</i>
Rancillac et al. (1982)	<i>seedlings</i>	<i>P.pinaster</i>
Biondi & Thorpe (1982)	cotilédones	<i>P.radiata</i>
David et al. (1982)	<i>seedlings</i>	<i>Pinus</i> spp,
	e acículas	<i>P.pinaster</i>
Rancillac et al. (1982)	gemas de	<i>P.pinaster</i>
	<i>seedlings</i>	
Horgan & Aitken (1981)	embrião zigótico	<i>P.radiata</i> D.Don.
	e <i>seedlings</i>	
Yeung et al. (1981)	cotilédones	<i>P.radiata</i> D.Don.
Sommer et al. (1975)	embrião zigótico	<i>P.palustris</i> Mill.

Tabela 2 - Resumo dos principais autores, objetivos e meios de cultura utilizados para a micropropagação em *Pinus*.

AUTORES	Principal objetivo	Meio de Cultura
Férriz et al. (1994)	indução de gemas adventícias	SH modificado
Mazari & Camm (1993)	efeito da citicininina na organogênese	meio desenvolvido por von Arnold & Erickson (1981)
Go et al. (1993)	teste de progênie de <i>Pinus caribaea</i> <i>in vitro</i>	MS modificado, SH modificado, GD modificado, CBM modificado
Halos & Go (1993)	micropropagação de <i>Pinus caribaea</i> Morelet	MS modificado por Franco & Schwarz (1985)
Pulido et al. (1992)	indução de gemas em cotilédones	MCM sais
Lambardi et al. (1991)	indução de gemas em embriões maduros	AE, DCR, MCM, SH, QP
Peralta & Cabrera (1991)	micropropagação em espécies coníferas	SH modificado
Chang et al. (1991)	propagação clonal através de organogênese <i>in vitro</i>	GD
Jang & Tainter (1991)	micropropagação de várias espécies de <i>Pinus</i>	GD modificado, SH modificado, LP modificado Lityay's et al. (1985) modificado
Saravitz et al. (1991)	micropropagação através de cotilédones de <i>Pinus virginiana</i>	GD modificado BLG modificado
Burns et al. (1991)	multiplicação de gemas originárias de <i>seedlings</i>	GD modificado, SH modificado, PBS e "meio C" modificado
Bergmann & Stomp (1991)	formação de gemas adventícias em nove espécies de <i>Pinus</i>	LP modificado, MS modificado
Thorpe (1990)	estudo estrutural, fisiológico e bioquímico da organogênese	SH modificado

Tabela 2 - continuação.

AUTORES	Principal objetivo	Meio de Cultura
Pulido et al. (1990)	regeneração <i>in vitro</i> de <i>P. canariensis</i>	SH modificado, MCM modificado, QP modificado, AE modificado
Lesney (1989)	produção de lignina e crescimento em suspensão de células	MS Lityay's et al. (1985)
Abdullah et al. (1989)	efeito de auxinas e citocininas na indução de raiz e gemas adventícias	SH modificado
Kumar et al. (1988)	estudos bioquímicos durante a cultura <i>in vitro</i> do <i>P. radiata</i>	SH modificado
Thorpe (1988)	estudo fnológico da indução de gemas em coníferas	SH modificado
Skidmore et al. (1988)	cultura <i>in vitro</i> de <i>Pinus caribaea</i> em meio líquido	LP modificado
Zel et al. (1988)	micropropagação do <i>Pinus sylvestris</i>	MS modificado
Schwarz et al. (1988)	resgate de planta a partir de embrião zigótico	MS modificado
Lesney et al. (1988)	manipulação <i>in vitro</i> do <i>P. elliottii</i>	GD modificado
Webb et al. (1988)	micropropagação do <i>P. strobus</i> L.	SH modificado
Tranvan et al. (1988)	estudo morfológico e histológico durante a formação de gemas adventícias	Solução I de DAVID et al. (1982)
Bronson & Dixon (1988)	Indução de gemas adventícias em cotilé-dones	GD modificado
Grönroos & von Arnold (1987)	indução de raiz adventícia em hipocótilo	solução de HOAGLAND
Abdullah & Grace (1987)	regeneração <i>in vitro</i> através de acículas jovens	SH modificado
Kaul (1987)	regeneração de planta a partir de hipocó-tilo-cotiledonar <i>in vitro</i>	MS modificado, LITVAY et al. (1981), GD modificado
Ellis & Judd (1987)	SDG-PAGE - análise em gemas adventí-cias (Bioquímica - estudo)	SH modificado, Linsmaier & Skoog modificado (1975)

Tabela 2 - continuação.

AUTORES	Principal objetivo	Meio de Cultura
Bermúdez & Sommer (1987)	fatores que afetam a indução de gemas adventícias em embriões	meio A, meio B e meio C
Mudge (1986)	micropropagação a partir de embriões e <i>seedlings</i>	GD
Christie et al. (1985)	estudo da formação de gema <i>in vitro</i>	meio descrito por Aitken et al. (1981)
Abdullah et al. (1985)	adventícia - formação de gemas em embrião e cotilédone	SH modificado, GD modificado, MS modificado
Mckeand & Allen (1984)	nutrição e desenvolvimento da raiz	meio desenvolvido pelo autor
Patel & Thorpe (1984)	estudo histoquímico durante a indução de gemas <i>in vitro</i>	SH modificado
Villalobos et al. (1984)	indução de gemas adventícias em cotilé-dones excisados	SH modificado
Villalobos et al. (1983)	indução de gemas adventícias através do uso de citicininina	SH modificado
Rancillac et al. (1982)	indução de raiz	MS modificado
Biondi & Thorpe (1982)	estudo bioquímico durante a indução adventícia de gemas	SH modificado
David et al. (1982)	indução de gemas adventícias em cotilé-dones e acículas	MS modificado I e II
Rancillac et al. (1982)	indução de raiz a partir de gemas clonais	MS modificado e MARGARA (1977)
Horgan & Aitken (1981)	resgate de plantas a partir de gemas in-duzidas em embriões e <i>seedlings</i>	SH modificado
Yeung et al. (1981)	estudo histológico da indução de gemas em cotilédones	SH modificado
Sommer et al. (1975)	indução de gemas adventícias em cotilé-dones	GD modificado; Risses e White (1964) modificado

2.2. Uso de antibióticos em meio de cultura

Durante o processo de estabelecimento de cultura, além dos problemas de adequação nutricional e seleção de explantes, nos deparamos com a busca de métodos de desinfecção para eliminação de fungos e bactérias que possam vir a inviabilizar o desenvolvimento da cultura.

Young et al. (1984) isolaram bactérias de 13 espécies de plantas lenhosas procurando identificar e determinar a ação de antibióticos como a tetraciclina, polymixin B, rifampicin e cefotaxime. Isoladamente a ação dos antibióticos combatem apenas algumas bactérias. A ação mais adequada seria a combinação de antibióticos, porém pode-se induzir toxidez ao explante.

Leifert et al. (1992) testaram combinações de vários antibióticos em meio de cultura, polymixin, carbenicillin, rifampicin, streptomycin, em várias concentrações, com culturas de Liliaceae, Iridaceae e Rosaceae, notando que ocorre efeito inibitório desses antibióticos ao crescimento dos explantes, sendo que a streptomycin tem a menor influência no crescimento dos explantes.

Kneifel & Leonhardt (1992), utilizaram 28 diferentes tipos de antibióticos e 7 combinações para eliminação de bactérias gram-positivas e gram-negativas, em meio de cultura, tendo como explantes *Drosera rotundifolia*, *Spatiphyllum* sp., *Syngonium* cv. White, "butterfly" *Mephrolepsis exaltata* cv. Teddy Júnior. As combinações dos antibióticos Imipenem/Ampicillin e Imipenem/Penicillin G em 5 mg/l, mostraram-se mais eficientes.

Barrett & Cassells (1994) fizeram combinações de antibióticos e uso isolado destes para eliminação de *Xanthomonas campestris* cv. *pelargonii*, microrganismo

comum em meios de cultura e de difícil eliminação. O resultado mais adequado e que permitiu o desenvolvimento do explante foi o Cefotaxim a 500 mg/l. Outros antibióticos podem ser indicados como a Gentamicina, a Tetraciclina e a Erithromicina, porém, com interferência no desenvolvimento do explante.

Tynan et al. (1993) testaram o Miconazole, produto comercial, no controle de 4 omicetos, 11 denteromicetos, 4 ascomicetos e 4 contaminantes do ar encontrados em laboratórios de cultura de tecidos. Os resultados demonstraram diminuição no nível de contaminação, porém, não a eliminação dos fungos.

A alteração do pH do meio de cultura é outro método indicado para eliminação de microrganismos. Leifert et al. (1994) prepararam meios com pH 3,5 e conseguiram o controle de *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumillis*, *Pseudomonas maltophilis* e *Xanthomonas campestris*.

2.3. Uso de meio de cultura líquido

Lal & Ahuja (1993) testaram o uso da consistência líquida do meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) em *Rheum emodi* (planta medicinal indiana), chegando ao resultado que para número de gemas produzidas ele é mais adequado quando o explante fica submerso no líquido, em comparação ao método tradicional de meio na forma gel.

Experimentos realizados em *Rosa chinensis*, demonstraram que o meio de cultura na consistência líquida permitiu maior ganho de peso fresco após 4 semanas de cultivo, quando comparado ao meio de cultura na consistência gel, segundo Chu et al.

(1993). Este mesmo trabalho indica que a ação do BAP é mais adequada em meio líquido em relação a gel, após 4 semanas em subcultura.

Outros autores testaram meios de suporte para culturas *in vitro*, como foi o caso de Bhattacharya et al. (1994) que utilizaram o sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) o isobgol (*Plantago ovata* Forsk), filtro de papel, outros produtos de suporte à base de nylon ou polyester, em propagação de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). A performance do crescimento de raiz e gemas em meios de cultura líquido foi idêntico à performance do crescimento de raiz e gemas em meios geleificados.

Skidmore et al. (1988) utilizaram suporte à base de polyester em placas de petri de 3,5 cm de diâmetro com solução LP para indução de gemas adventícias em *Pinus caribaea* Morelet, obtendo resultado satisfatório e indicando o método como adequado para o processo.

Outro aspecto a ser abordado em relação à substituição dos meios geleificados por meio líquido é o fato de que a composição dos primeiros não é constante. Pochet et al. (1991) verificaram diferenças na concentração de SO₄, Na, K, P, Mg, Ca, Fe e B em ágar Kadoya, Roland e Roth, o que alterariam a composição dos meios de cultura e poderiam influenciar no resultado dos experimentos.

Arnold & Eriksson (1984) verificaram também que o aumento da concentração do agar em meio de cultura, para possibilitar a melhor consistência da cultura pode restringir a difusão de nutrientes, causando deficiências nutricionais aos explantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia das Árvores, do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo, com a colaboração da Duraflora S/A, responsável pelo fornecimento dos explantes.

Os experimentos tiveram seu início no período de março de 1992, com o plantio de semente de *Pinus elliottis* var. *elliotti* em casa de vegetação e posterior desinfestação e inoculação *in vitro*, até março de 1995, com a última análise dos dados e manutenção dos explantes em sala de crescimento.

3.1. Origem e preparo dos explantes

As sementes que deram início a este trabalho, são originários de árvores selecionadas para produção de resina, estabelecida na fazenda da Duraflora S/A, município de Agudos, em processo de polinização não controlada, mantida em câmara fria na empresa.

Nas dependências do Departamento de Ciências Florestais, parte dessas sementes foram cultivadas em casa-de-vegetação pelo período de 5 semanas ou 45 dias, e parte levada para o laboratório de Fisiologia das Árvores.

As sementes levadas para casa-de-vegetação sofreram processo de quebra de dormência e foram plantadas em bandeja com terra, sob condições controladas e nutridas com soluções MS, GD, EE e ZX completa, porém sem sacarose, diluída a $\frac{1}{4}$ e aplicada semanalmente, durante o período em que permaneceu nestas instalações. A aplicação de fungicida a base de Benomyl (Benlate) foi realizada uma semana antes da colheita, na concentração de 1 g para cada 5 litros de água, pulverizado sobre o material. Após o prazo de 5 semanas ou 45 dias, as plântulas foram seccionadas na altura do hipocótilo e a parte superior foi levada ao laboratório de Fisiologia Vegetal, onde foram padronizadas e lavadas por 30 minutos em água corrente e em seguida imersas em solução de bicoloreto de mercúrio, sob agitação, a 250 mg/l e 10 gotas de detergente comercial, durante 1 hora. Em seguida, os explantes foram lavados com água destilada e esterilizados e posteriormente colocado *in vitro*.

As sementes que foram levadas diretamente ao laboratório sofreram processo de quebra de dormência, através da imersão em água congelada (-10°C a -15°C) por 24 horas e posterior período em câmara fria a 4°C por 24 horas. Ainda com casca, receberam tratamento com solução de hipoclorito de sódio comercial, a 2% de cloro ativo, por 10 min. (2 gotas em 30 ml de água), lavagem e retirada da mesma. O processo de isolamento dos explantes foi realizado com bisturi e pinça, na câmara de fluxo laminar, com auxílio de lupa e imediato inoculação da parte superior do embrião, com a cotilidone, em meio de cultura adequado (MS-cotil, GD-cotil, EE-cotil e ZX-cotil), (Figura 1).

PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Figura 1. Esquema do preparo dos meios de cultura utilizados.

O processo de estabelecimento da cultura *in vitro* e análises das ocorrências estão no Quadro 1, para parte superior do embrião; Quadro 2, para parte superior das plântulas. Os meios de cultura utilizadas fazem parte do Anexo 2 e 3 respectivamente.

As culturas permaneceram em condições da sala de crescimento, com temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e iluminância de 1000 lux, fornecida por luz branca fria, localizada a 30 cm acima do nível de cada prateleira, proveniente de 2 lâmpadas de 110W cada, modelo H.O. marca Sylvania.

3.2. Desenvolvimento dos experimentos

3.2.1. Parte superior do embrião

As sementes das quais foram retirados os explantes, foram conduzidas para câmara de fluxo laminar, onde aleatoriamente eram abertas. O material, no caso o embrião, foi seccionado a aproximadamente 3,0 mm do ápice e inoculado a parte superior contendo os cotilédones, todos juntos. No meio de cultura líquido, quando não ocorria o contato do explante com este, fazia-se a adição de mais meio, através de uma pipeta previamente desinfestada com hipoclorito de sódio comercial e lavado com água esterilizada.

O tubo de ensaio era então vedado e a cada sete dias verificava-se o nível da solução nutritiva. Caso houvesse necessidade, completava-se com solução estoque.

O experimento consta de 6 tratamentos, incluindo as testemunhas, cada um com vinte explantes, marcados e individualizados. Este processo de indução de gemas adventícias e crescimento do explante durou 30 dias, ao final dos quais cada tubo de ensaio foi levado para sala de pesagem, onde a balança analítica foi limpa e desinfestada, na medida do possível com álcool nas partes internas. Os explantes foram então pesados e devolvidos ao tubo de ensaio, levados a câmara de fluxo para avaliações outras e novamente colocadas na sala de crescimento.

Este método individualizado de análise dos explantes foi escolhido devido ao fato da quantidade de explantes que teriam que ser inoculados para uma análise destrutiva, ou seja, descarte após pesagem, eram inviáveis para o programa. Correu-se o risco de contaminação. Neste caso, a observância deste item foi constante. À menor indicação da presença de contaminante, o tubo de ensaio com o explante era levado para a câmara de fluxo laminar e as partes contaminadas eram raspadas, no caso de fungos e, no caso bactérias, o meio era substituído. Em ambos, os explantes ficaram imersos em solução de sulfato de gentamicina a 10,00 mg/l, durante período de 24 horas.

Cada tubo de ensaio recebeu apenas um explante, num total de 20 tubos para cada meio de cultura, consistência e concentração de regulador de crescimento, sendo analisados 15. Agindo desta forma, os resultados e as modificações ocorridas durante o processo puderam ser melhor controladas. Este procedimento teve continuidade até o final dos testes. Trinta dias após os explantes terem ficado em meio de indução, foram inoculados em meio de cultura livre de reguladores de crescimento, para desenvolvimento e alongamento celular.

As variáveis adotadas para avaliação dos cotilédones foram:

$$\text{a) Taxa de crescimento relativo} = \frac{\ln \text{PMF}_2 - \ln \text{PMF}_1}{\Delta T} \times 100$$

onde: ln = logaritmo neperiano

PMF₂ = produção de matéria fresca no período de tempo final

PMF₁ = produção de matéria fresca no período de tempo inicial

$\Delta T \Rightarrow T_2 = \text{tempo final} - T_1 = \text{tempo inicial}$

Valor tomado a cada trinta dias.

b) Comprimento e diâmetro na fase de indução (30 dias iniciais em meio cultura).

c) Comprimento e diâmetro na fase de alongamento (60 e 90 dias após a inoculação).

d) Número de gemas induzidas após 30 dias da inoculação avaliada de acordo com os seguintes parâmetros:

	Valor
A - de 1 a 27 gemas induzidas	1
B - de 28 a 55 gemas induzidas	2
C - de 56 a 83 gemas induzidas	3
D - de 84 a 111 gemas induzidas	4

Analisando-se pró-meristemóides, meristemóides e gemas morfológicamente definidas.

e) Número de gemas maiores que 5 mm após 15 semanas.

3.2.2. Parte superior dos explantes de *seedlings* ou plântulas

Os *seedlings* uma vez na câmara de fluxo laminar, eram uniformizados, seccionadas na altura do hipocótilo e inoculados na superfície de meio de cultura gel ou líquido com 2,5 e 5,0 mg/l de BAP nos primeiros 60 dias e transferidos para meio de cultura isento de reguladores, durante o restante da experimentação.

Os procedimentos em relação a inoculação em meio líquido foram os mesmos adotados para explantes cotiledonares.

Cada tubo de ensaio recebeu apenas um explante, num total de 20 tubos para cada meio de cultura, consistência e concentração do regulador de crescimento, sendo analisados 15.

A avaliação foi individualizada e o peso tomado um a um, seguindo-se os procedimentos adotadas para cotilédones.

As variáveis adotadas para se verificar a evolução foram:

a) Taxa de crescimento relativo, tomada a cada 30 dias até o 120º dia de cultura.

b) Avaliação do número de gemas induzidas através da análise de classe, conforme realizado com explantes cotiledonares, considerando-se Ind.1 e Ind.2 (processo de indução) e alongamento.

3.3. Relação dos experimentos realizados

Experimento 1: Influência dos meios de cultura MS-cotil, GD-cotil, EE-cotil e ZX-cotil, nas consistências gel e líquida, nas concentrações de 0,5 mg/l e 1,0 mg/l de BAP sobre a T.C.R. da parte superior do embrião, analisados nas fases de Ind, Along1 e Along2. (Tabelas 3, 4, 5 e 6).

Experimento 2: Influência dos meios de cultura MS-cotil, GD-cotil, EE-cotil e ZX-cotil, nas consistências gel e líquida, em concentrações de 0,5 mg/l e 1,0 mg/l de BAP, sobre o comprimento e o diâmetro da parte superior do embrião, tomados 30 dias após a inoculação, (Tabelas 7, 8, 9 e 10).

Experimento 3: Influência dos meios de cultura MS-cotil, GD-cotil, EE-cotil e ZX-cotil nas consistências gel e líquida, sobre o comprimento da parte superior do embrião, tomado aos 60 e 90 dias após a inoculação. (tabelas 11, 12, 13 e 14).

Experimento 4: Influência dos meios de cultura MS-cotil-cotil, GD-cotil, EE-cotil e ZX-cotil nas consistências gel e líquida, em concentrações de 0,5 mg/l e 1,0 mg/l de BAP, sobre o número de gemas induzidas, avaliadas 30 dias após a inoculação, na parte superior do embrião. (Tabelas 15, 16, 17 e 18)

Experimento 5: Influência dos meios de cultura MS-A, EE-A, GD-A e ZX-A, nas consistências gel e líquida, em concentrações de 2,5 mg/l e 5,0 mg/l de BAP sobre a T.C.R., na parte superior das plântulas ou *seedlings*. (Tabelas 19, 20, 21 e 22).

Experimento 6: Influência dos meios de cultura MS-A, EE-A, GD-A e ZX-A, nas consistências gel e líquida, em concentrações de 2,5 mg/l e 5,0 mg/l de BAP, sobre a classe de gemas na fase de Ind1 e Ind2 e número de gemas maiores que 5 mm, na parte superior das plântulas ou *seedlings* tomadas após 15 semanas. (Tabelas 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29).

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, no esquemas fatorial 4 x 3 x 2, para os experimentos 1, 2 e 5; 4 x 2 x 2 para os experimentos 4 e 6; 4 x 2 para o experimento 3.

Quadro 1 - Esquema metodológico usado para parte superior dos *seedlings* ou plântulas de *Pinus elliotii* var. *elliottii*, mantidas sob quatro meios de cultura, duas consistências e três níveis de reguladores de crescimento.

Peso Inicial	TCR1	Peso 30 dias	TCR 2	Peso 60 dias	TCR3	Peso 90 dias	TCR4	Peso 120 dias
MS-A-gel-líq. 0,0		MS-A-gel-líq. 0,0		MS-A-gel-líq. s/rc		MS-A-gel-líq. s/rc		MS-A-gel-líq. s/rc
MS-A-gel-líq. com 2,5 mg/l		MS-A-gel-líq. c/2,5		MS-A-gel-líq. s/rc		MS-A-gel-líq. s/rc		MS-A-gel-líq. s/rc
MS-A-gel-líq. com 5,0 mg/l		MS-A-gel-líq. c/5,0		MS-A-gel-líq. s/rc		MS-A-gel-líq. s/rc		MS-A-gel-líq. s/rc
EE-A-gel-líq. 0,0		EE-A-gel-líq. 0,0		EE-A-gel-líq. s/rc		EE-A-gel-líq. s/rc		EE-A-gel-líq. s/rc
EE-A-gel-líq. com 2,5 mg/l		EE-A-gel-líq. c/2,5		EE-A-gel-líq. s/rc		EE-A-gel-líq. s/rc		EE-A-gel-líq. s/rc
EE-A-gel-líq. com 5,0 mg/l		EE-A-gel-líq. c/5,0		EE-A-gel-líq. s/rc		EE-A-gel-líq. s/rc		EE-A-gel-líq. s/rc
GD-A-gel-líq. 0,0		GD-A-gel-líq. c/0,0		GD-A-gel-líq. s/rc		GD-A-gel-líq. s/rc		GD-A-gel-líq. s/rc
GD-A-gel-líq. com 2,5 mg/l		GD-A-gel-líq. c/2,5		GD-A-gel-líq. s/rc		GD-A-gel-líq. s/rc		GD-A-gel-líq. s/rc
GD-A-gel-líq. com 5,0 mg/l		GD-A-gel-líq. c/5,0		GD-A-gel-líq. s/rc		GD-A-gel-líq. s/rc		GD-A-gel-líq. s/rc
ZX-A-gel-líq. 0,0		ZX-A-gel-líq. c/0,0		ZX-A-gel-líq. s/rc		ZX-A-gel-líq. s/rc		ZX-A-gel-líq. s/rc
ZX-A-gel-líq. com 2,5 mg/l		ZX-A-gel-líq. c/2,5		ZX-A-gel-líq. s/rc		ZX-A-gel-líq. s/rc		ZX-A-gel-líq. s/rc
ZX-A-gel-líq. com 5,0 mg/l		ZX-A-gel-líq. c/5,0		ZX-A-gel-líq. s/rc		ZX-A-gel-líq. s/rc		ZX-A-gel-líq. s/rc
		Ind. 1		Ind. 2		15 semanas gema > 5 mm		15 semanas gema > 5 mm

s/rc = sem regulador de crescimento; MS-A - meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) modificado; EE-A - meio de cultura de Eeuwens (1976) modificado; GD-A - meio de cultura de Gresshoff & Doy (1972) modificado; ZX-A - meio de cultura ZX-A; Ind.1 Fase de indução 1; Ind.2 - Fase de indução 2; TCR - Taxa de crescimento relativo.

Quadro 2 - Esquema metodológico usado para parte superior do embrião de *Pinus elliotii* var. *elliottii*, mantidos sob diferentes tipos de meios de cultura (EE-cotil, MS-cotil, GD-cotil, ZX-cotil) em diferentes consistências (gel, líquida) e sob várias concentrações de regulador de crescimento.

Peso Inicial - (15 explantes)	Indução	Peso 30 dias	Along.1	Peso 60 dias	Along. 2	Peso 90 dias	Along.3	Peso 120 dias
EE-gel-líq. s/r.c.		EE-gel-líq. s/r.c.		EE-gel-líq. s/r.c.		EE-gel-líq. s/r.c.		EE-gel-líq. s/r.c.
EE-gel-líq. com 0,5 mg/l BAP		EE-gel-líq. s/r.c.		EE-gel-líq. s/r.c.		EE-gel-líq. s/r.c.		EE-gel-líq. s/r.c.
EE-gel-líq. com 1,0 mg/l BAP		EE-gel-líq. s/r.c.		EE-gel-líq. s/r.c.		EE-gel-líq. s/r.c.		EE-gel-líq. s/r.c.
MS-gel-líq. s/r.c.		MS-gel-líq. s/r.c.		MS-gel-líq. s/r.c.		MS-gel-líq. s/r.c.		MS-gel-líq. s/r.c.
MS-gel-líq. com 0,5 mg/l BAP		MS-gel-líq. s/r.c.		MS-gel-líq. s/r.c.		MS-gel-líq. s/r.c.		MS-gel-líq. s/r.c.
MS-gel-líq. com 1,0 mg/l BAP		MS-gel-líq. s/r.c.		MS-gel-líq. s/r.c.		MS-gel-líq. s/r.c.		MS-gel-líq. s/r.c.
GD-gel-líq. s/r.c.		GD-gel-líq. s/r.c.		GD-gel-líq. s/r.c.		GD-gel-líq. s/r.c.		GD-gel-líq. s/r.c.
GD-gel-líq. com 0,5 mg/l BAP		GD-gel-líq. s/r.c.		GD-gel-líq. s/r.c.		GD-gel-líq. s/r.c.		GD-gel-líq. s/r.c.
GD-gel-líq. com 1,0 mg/l BAP		GG-gel-líq. s/r.c.		GG-gel-líq. s/r.c.		GG-gel-líq. s/r.c.		GG-gel-líq. s/r.c.
ZX-gel-líq. s/r.c.		ZX-gel-líq. s/r.c.		ZX-gel-líq. s/r.c.		ZX-gel-líq. s/r.c.		ZX-gel-líq. s/r.c.
ZX-gel-líq. com 0,5 mg/l BAP		ZX-gel-líq. s/r.c.		ZX-gel-líq. s/r.c.		ZX-gel-líq. s/r.c.		ZX-gel-líq. s/r.c.
ZX-gel-líq. com 1,0 mg/l BAP		ZX-gel-líq. s/r.c.		ZX-gel-líq. s/r.c.		ZX-gel-líq. s/r.c.		ZX-gel-líq. s/r.c.
Avaliações		Número de gemas induzidas				Gemas maior que 5 mm		
Avaliações		Comprimento e diâmetro		Comprimento e diâmetro		Comprimento e diâmetro		
		T.C.R. 1		T.C.R. 2		T.C.R. 3		

s/r.c = sem regulador de crescimento; TCR 1, 2, 3 - Taxa de crescimento 1, 2 e 3; Along. 1, 2, 3 - Fase de alongamento 1, 2 e 3; MS - meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) modificado; EE - meio de cultura de Beuvers (1976) modificado; GD - meio de cultura de Gresshoff & Doy (1972) modificado.

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeitos dos meios de cultura

Como pode-se observar nas Tabelas 3 e 19, houve diferença significativa entre os meios de cultura testados em função da taxa de crescimento relativo, para os explantes considerados.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para taxa de crescimento relativo, nas fases de indução e alongamento da parte superior do embrião de *Pinus elliottii* var. *elliotti*, submetidas a quatro diferentes meios de cultura (EE-cotil, GD-cotil, MS-cotil e ZX-cotil), duas consistências (gel e liq) e dois níveis hormonais (0,5 e 1,0 mg/l de BAP) e testemunha (0 mg/l BAP).

Fonte de variação	gl	Quadrados médios		
		TCR ₁ (30 dias)	TCR ₂ (60 dias)	TCR ₃ (90 dias)
meio	3	0,4765**	0,023 **	0,04670**
consistência	1	0,4581**	0,0076 (ns)	0,04015**
conc. do reg. de cresc.	2	0,2726**	0,4186 **	0,05075**
meio x consistência	3	0,8750**	0,01338**	0,01151 (ns)
meio x conc. reg. cresc.	6	0,4736**	0,05224**	0,02857**
cons.x conc. do reg. de cresc.	2	0,6042**	0,02698**	0,006819 (ns)
Resíduo	343	0,0324112	0,0031728	0,0056462
Total	360	-	-	-
CV (%)		17,64	36,82	58,24
média geral		10,2916	1,5450	1,3016

(ns) não significativo pelo teste F; (x) significativo pelo teste F, $p < 0,05$

(xx) = significativo pelo teste F, $p < 0,01$; TCR 1, 2 e 3 = Taxa de crescimento relativo 1, 2 e 3.

Tabela 19 - Resumo da análise de variância para TCR da parte superior das plântulas ou *seedlings* de *Pinus elliottii* var. *elliottii* considerando-se: taxa de crescimento relativo para avaliações realizadas a cada 30 dias, 4 diferentes meios de cultura, duas consistências (gel e líquida) e dos níveis de reguladores de crescimento (2,5 e 5,0mg/l) e testemunha T (0).

Fonte de variação	gl	Quadrados Médios			
		TCR1	TCR2	TCR3	TCR4
meio	3	0,1964**	0,109**	0,0689**	0,0462**
consistência	1	0,0020(ns)	0,218**	0,133**	0,0749**
conc. do reg. de cresc.	2	0,0055(ns)	0,0069**	0,017**	0,018**
meio x consistência	3	0,0108*	0,0043**	0,0012 (ns)	0,00444**
meio x conc. reg. cresc.	6	0,0138**	0,0043**	0,00314**	0,00217**
consist. x conc. reg. cresc.	2	0,0026(ns)	0,0053**	0,00288*	0,00048(ns)
Resíduo	343	0,0039372	0,0007113	0,0006757	0,000555
Total	360	-	-	-	-
CV (%)		35,67	25,96	29,70	32,93
Média geral		1,7740	1,0362	0,8820	0,7215

(ns) não significativo pelo teste F

(*) significativo pelo teste F, $p < 0,05$

(**) significativo pelo teste F, $p < 0,01$

TCR 1, 2, 3, 4 = Taxa de crescimento relativo 1, 2, 3 e 4.

A Tabela 7 para comprimento e diâmetro do explante evidenciou a diferença significativa existente entre os meios de cultura e também a Tabela 11 para os fatores comprimento averiguados aos 60 e 90 dias após a inoculação.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para comprimento (C) e diâmetro (d) da parte superior do embrião de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, aos 30 dias, submetidos a quatro meios de cultura EE-cotil, GD-cotil, MS-cotil e ZX-cotil, nas consistências gel e líquida, com 0 (zero); 0,5; 1,0 mg/l de BAP.

Fonte de variação	gl	Quadrados médios	
		comprimento (cm)	diâmetro (cm)
meio	3	25,7008 **	0,2272 *
consistência	1	5,9033 **	0,0122 (ns)
conc. do reg. de cresc.	2	19,1521 **	0,0060 (ns)
meio x consistência	3	1,6954 **	0,1089 *
meio x conc. reg. cresc.	6	2,1934 **	0,05639 (ns)
consist. x conc. reg. cresc.	2	1,0191 *	0,02025 (ns)
Resíduo	343	0,25670	0,0392204
Total	360	-	-
CV%		29,0753	53,55
média geral		1,758	0,3730

(ns) não significativo pelo teste F

(*) significativo pelo teste F < 0,05

(**) significativo pelo teste F < 0,01

Tabela 11 - Resumo da análise de variância para tamanho da parte superior do embrião, avaliados aos 60 e 90 dias após a inoculação em meio de cultura (EE-cotil, GD-cotil, MS-cotil e ZX-cotil) e em duas consistências (gel e líquida).

Fonte de variação	gl	Quadrados médios	
		Comprimento (cm) 60 dias	Comprimento (cm) 90 dias
meio	3	44,07088 **	94,69777 **
consistência	1	9,86133 **	25,392 **
meio X consistência	3	1,40066 *	3,16666 **
Resíduo	113	0,5114524	0,7236548
Total	120	-	-
CV%		21,91498	19,43669
Média geral		3,26334	4,37667

(ns) não significativo pelo teste F

(*) significativo pelo teste F, p < 0,05

(**) significativo pelo teste F, p < 0,01

Nos resultados da Tabela 15, o número de gemas e gemas maiores que 5mm, após 15 semanas, para a parte superior do embrião e número de gemas e gemas maiores que 5mm, após 15 semanas Tabela 23, para a parte superior das plântulas demonstraram a influência dos meios de cultura utilizados.

Tabela 15 - Resumo da análise de variância para classe de gemas (NG), após o período de 30 dias, e gemas que apresentam tamanho maior que 5 mm (NG > 5) após período de incubação de 15 semanas da parte superior do embrião de *Pinus elliottii* var. *elliottii* em três diferentes meios de cultura (EE-cotil, GD-cotil, MS-cotil e ZX-cotil) com duas consistências (gel e líquida), submetidas inicialmente a 0,5 e 1,0 mg/l de BAP.

Fonte de variação	Quadrados médios		
	gl	NG	NG > 5 mm
meio	3	19,7486**	18,6819**
consistência	1	6,3375**	22,2041**
con. do reg. de cresc.	1	0,0375(ns)	8,4375(ns)
meio x consistência	3	3,9263**	2,2819(ns)
meio x conc. reg. cresc.	3	0,2486(ns)	9,6486*
consist. x conc. reg. cresc.	1	1,8375(ns)	10,0041(ns)
Resíduo	228	0,6590306	2,591483
Total	240	-	-
CV%		37,21	23,1645
média geral		2,1958	6,9958

(ns) não significativo pelo teste F

* significativo pelo teste F, $p < 0,05$

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$

NG: classe de gemas

NG > 5 mm: número de gemas maiores que 5 mm.

Tabela 23 - Resumo da análise de variância para classes de gemas e gemas maiores que 5 mm, analisadas nas fases (Ind.1) e (Ind.2) e a segunda na fase de alongamento de *Pinus elliottii* var. *elliottii* submetido a três meios de cultura em duas consistências e dois níveis hormonais.

Fonte de variação	gl	Quadrados médios		
		Ind.1 - NG (30 dias)	Ind.2 - NG (60 dias)	15 semanas NG > 5 mm
meio	3	1,1597*	6,2041 (*)	89,859(*)
consistência	1	3,0375*	1,8375 (*)	85,204 (*)
conc.do reg. de cresc.	1	0,337(ns)	0,337 (ns)	5,104 (ns)
meio x consistência	3	1,45972*	4,570 (*)	2,1375 (ns)
meio x conc. reg. cresc.	3	0,82638*	0,3819 (ns)	0,6375 (ns)
consist. x conc. reg. cresc.	1	0,00416(ns)	1,2041 (ns)	12,6041 (ns)
Resíduo	228	0,3312775	0,3894273	5,3762114
Total	240	-	-	-
CV (%)		37,68	29,38	34,77
média geral		1,5375	2,1375	6,7125

(ns) não significativo pelo teste F

(*) significativo pelo teste F, $p < 0,05$

(**) significativo pelo teste F, $p < 0,01$

Ind1 - NG - Classe de gemas na fase de indução 1

Ind2 - NG - Classe de gemas na fase de indução 2

Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Jang & Tainter (1991) que utilizaram o meio de cultura de Litvay et al. (1985) comparado com o meio SH, GD e LS, determinando que o primeiro causava menor crescimento de gemas adventícias e possível vitrificação.

Lambardi et al. (1991) também constataram que há diferenças entre os meios de cultura AE, DCR, MCM, SH e QP para a porcentagem de explantes produzindo gemas e número de gemas por explante, sendo o DCR mais adequado para o primeiro fator e meio AE para o segundo.

Chesick et al.(1991) utilizaram os meios de cultura LP, SH, GD e MS obtendo os melhores resultados, para porcentagem de embriões vivos após 1 mês de cultivo em LP seguido de SH, MS e GD.

Burns et al. (1991) utilizaram os meios de cultura MS, GD e PBS, considerando o GD mais adequado para número de gemas por explante.

Bermudez & Sommer (1987) identificaram que os meios de cultura com alto teor de amônia por eles testados, induziram baixas quantidades de gemas por embrião. Enquanto os meios de cultura que possuíam quantidades baixas de NH_4^+ ou mesmo ausência, tendo como única fonte nitrogenada o nitrato, tinham maiores quantidades de gemas por embrião. Estes resultados, segundo os autores, sugerem que a capacidade morfogénica dos explantes é limitada pela composição nutricional dos meios de cultura. Outros trabalhos como os de Chalupa¹, Konar & Singh² e Sommer et al.³ em *Pinus*, também reportaram melhores resultados quando a amônia é omitida ou reduzida drasticamente em meio de cultura.

David et al. (1982) testaram a composição de dois meios de cultura, I e II, determinando qual a relação NH_4^+/K^+ quando está em torno de 1,0 favorece a atividade morfogénica em *Pinus pinaster*. Porém quando esta relação cai para valores menores que 1,0 até 0,1 ocorre diminuição desta capacidade.

Horgan & Aitken (1981) obtiveram maior porcentagem de formação de gemas adventícias em *Pinus radiata* D. Don. com uso de meios de cultura SH a 2% de

¹ CHALUPA, V. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. *Cummun. Inst. For. Cech*, v.13, p.7-39, 1983.

² KONAR, R.N.; SINGH, M.H. Induction of shoot buds from tissue cultures of *Pinus wallichiana*. *Z. Pflanzenphysiol.*, n.99, p.173-177, 1980.

³ SOMMER, H.E.; BROWN, C.L.; KORMANIK, P. Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue culture *in vitro*. *Bot. Gaz.*, n.136, p.196-200, 1975.

sacarose (82%), seguido de SH com 3% de sacarose (70%), meio de Risser & White (1964) (66%), SH com 0,5mg/l de GA₃ (62%), GD modificado por Sommer et al. (1975), meio número 1a (GD) com 59%, DL (1975) com 43% e LS (1965) com 35%.

4.2. Efeito das consistências

Assim como constatado no trabalho de Chu et al. (1993), o meio de cultura na fase ou consistência líquida pode substituir o meio de cultura na fase ou consistência gel, conforme observado na Tabela 5, em TCR2 e TCR3 e Tabela 10, valor do comprimento e diâmetro aos 30 dias, e Tabela 18 de comprimento aos 60 e 90 dias, todas para as partes superior do embrião. Tabela 20 para TCR1, TCR2, TCR3 e TCR4, Tabela 28, Ind2-NG, Tabela 29, NG > 5 mm, estes para as partes superiores das plântulas.

Tabela 5 - Valores médios da taxa de crescimento relativo, nas fases de TCR₁, TCR₂ e TCR₃, da parte superior do embrião de *Pinus elliotii* var. *elliottii*, mantidos em duas consistências (gel e líquida).

Fonte de variação	Médias		
	TCR1	TCR2	TCR ₃
Gel	10,650 (A)	1,5915 (A)	1,1956 (B)
Líquido	9,935 (B)	1,499 (A)	1,4071 (A)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a p = 0,05.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a p = 0,05.

TCR 1, 2 e 3 = Taxa de crescimento relativo 1, 2 e 3.

Tabela 10 - Valores médios de comprimento e diâmetro de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, da parte superior do embrião aos 30 dias, submetidos a duas consistências (gel e líquida) de meio de cultura.

Fonte de variação	média	
	Comprimento (cm)	Diâmetro (cm)
Líquida	1,8861 (A)	0,3789 (A)
Gel	1,6300 (B)	0,3672 (A)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Tabela 18 - Valores médios de NG após 30 dias e NG > 5 de *Pinus elliottii* var. *elliottii* após 15 semanas em consistências gel e líquido.

Fonte de variação	Média	
	NG	NG > 5 mm
gel	2,358 (A)	7,300 (A)
líquido	2,033 (B)	6,692 (B)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

NG: classe de gemas

NG > 5 mm = número de gemas maiores que 5 mm.

Tabela 20 - Valores médios da T.C.R. da parte superior das plântulas ou *seedlings* de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, em duas consistências de meio de cultura (gel e líquida).

Fonte de variação	médias			
	TCR ₁	TCR ₂	TCR ₃	TCR ₄
Gel	1,7509 (A)	0,7894 (B)	0,6901 (B)	0,5771 (B)
Líquido	1,7981 (A)	1,2817 (A)	1,0747 (A)	0,8653 (A)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

TCR 1, 2, 3, 4 = Taxa de crescimento relativo 1, 2, 3 e 4.

Tabela 28 - Valores médios para NG na parte superior de plântulas ou *seedlings* de *P. elliotii* var. *elliotii*, submetidos a duas consistências de meio de cultura nas fases de Ind.1 e Ind.2.

Fonte de variação	média	
	Ind.1 - NG	Ind.2 - NG
Gel	1,65 (A)	2,05 (B)
Líquido	1,425 (B)	2,225 (A)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Ind.1 - NG = classe de gemas na fase de Indução 1

Ind.2 - NG = classe de gemas na fase de Indução 2

Tabela 29 - Valores médios para alongamento de gemas (maiores que 5 mm) da parte superior de plântulas ou *seedlings* de *Pinus elliotii* var. *elliotii* mantidos em duas diferentes consistências de meio de cultura.

Fonte de variação	Média
	NG > 5 mm
Líquido	7,308 (A)
Gel	6,117 (B)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

NG > 5 mm = número de gemas menores que 5 mm.

Trabalho como o de Von Arnold & Eriksson (1984), determinaram que o meio de cultura na consistência líquida pode facilitar a difusão de nutrientes, tendo em vista que em suas pesquisas, o aumento na concentração de agar provocou deficiências nutricionais.

Lal & Ahuja (1993) confirmaram que o uso de meio de cultura líquido aumenta o número de gemas em *Rheum emodi*.

4.3. Efeitos das concentrações do regulador de crescimento

Outra fonte de variação estudada foram as concentrações do regulador de crescimento (BAP). Para a indução de gemas adventícias na parte superior do embrião, a Tabela 15 (p. 39) demonstra que não há diferença significativa para número de gemas e gemas maiores que 5mm. Resultado semelhante se apresenta na Tabela 27 para a parte superior das plântulas, avaliados em relação ao número de gemas na Ind1 e Ind2 e gemas maiores que 5mm após 15 semanas. Estes resultados indicam que as concentrações de 0,5mg/l e 1,0mg/l de BAP, para embriões e 2,5mg/l e 5,0mg/l para plântulas podem estar muito próximas, para induzir variações detectáveis a nível estatístico.

Tabela 27 - Valores médios para gemas (maiores que 5 mm) da parte superior de plântulas ou *seedlings* de *P. elliottii* var. *elliottii* originários de dois níveis hormonais (2,5 e 5,0 mg/l de BAP) após 15 semanas.

Fonte de variação	Média
	NG > 5 mm
2,5	6,858 (A)
5,0	6,567 (A)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

NG > 5 mm = número de gemas maiores que 5 mm.

Sommer et al. (1975) obtiveram melhores resultados em cotilédones a 5mg/l de BAP, porém a análise foi porcentual e não estatística. Outros trabalhos como os de David et al. (1982), Abdullah et al. (1985), Bermudez & Sommer (1987), Bronson &

Dixon (1988) e Lambardi et al. (1991), também seguiram esta linha porcentual e não estatística, ficando difícil a comparação dos resultados.

Pulido et al. (1990 e 1992) adotaram métodos próprios de avaliação de evolução dos experimentos com reguladores de crescimento, o BFC (*Bud Forming Capacity*) e SEC (*Shoot Elongation Capacity*).

Bionde & Thorpe (1982) obtiveram estatisticamente melhores resultados com BAP na indução de gemas em cotilédones a 5×10^{-5} M (11,265 mg/l), mesmo resultado obtido por Schwarz et al. (1988). Comparando-se com o trabalho Chesick et al (1991) e Saravitz et al. (1991), nota-se que estas concentrações estão altas, em relação as usadas neste trabalho, ou seja 0,5 mg/l e 1,0 mg/l, para a parte superior dos embriões.

Porém Chang et al. (1992), Peralta & Cabrera e Halos & Go (1993), obtiveram melhores resultados para este mesmo tipo de explante com quantidade que variaram de 2,5 mg/l a 5,0 mg/l, mais próximos portanto àquelas utilizadas neste trabalho.

Em relação a indução e alongamento de gemas adventícias em explantes de embrião, os resultados da Tabela 26 e Tabela 27 (p. 45) mostraram resultados estatísticos que não diferiram. Porém, Webb et al. (1988) obtiveram, comparando doses de 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0mg/l de BAP, melhores resultados a 1,0mg/l deste regulador de crescimento.

Tabela 26 - Valores médios para NG de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, mantidos em duas diferentes concentrações (2,5 e 5,0 mg/l de BAP) nas fases de Ind.1 e Ind.2.

Fonte de variação	média	
	Ind.1 - NG	Ind.2 - NG
2,5	1,5750 (A)	2,155 (A)
5,0	1,50 (A)	2,1 (A)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Ind.1 - NG - classe de gemas na fase de Ind. 1

Ind.2 - NG - classe de gemas na fase de Ind. 2

Zel et al (1988) trabalharam com 1,0 μ M (0,22mg/l), 5 μ M (1,126mg/l), 10 μ M (2,25mg/l) e 50 μ M (11,26mg/l) de BAP, com resultados mais adequados a 50 μ M (11,265mg/l). Para Burns et al. (1991), 111 μ M (25mg/l) do regulador, produziram maior número de gemas por explante, quando comparado a doses de 22,2 μ M (5,0mg/l) e 222 μ M (50,01mg/l).

A Tabela 3 (p. 36) mostra que para doses do regulador de crescimento em TCR1, TCR2 e TCR3, ocorre diferença significativa a 1% de probabilidade, sendo que, o não uso, Tabela 6, resultou em melhor resultado para TCR1 e TCR2, igualando-se a 1,0mg/l em TCR3.

Tabela 6 - Valores médios da taxa de crescimento relativo (TCR₁, TCR₂ e TCR₃), da parte superior do embrião de *Pinus elliotii* var. *elliottii*, submetidos a dois níveis reguladores de crescimento mais a testemunha.

Fonte de variação	média		
	TCR ₁	TCR ₂	TCR ₃
0,0	10,824 (A)	2,2154 (A)	1,474 (A)
0,5	10,143 (B)	1,3159 (B)	0,10728 (B)
1,0	9,906 (B)	1,1021 (C)	1,356 (A)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a p = 0,05.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a p = 0,05.

TCR 1, 2 e 3 = Taxa de crescimento relativo 1, 2 e 3.

Em relação ao comprimento, Tabela 7 (p. 38), houve diferença a nível de 1% de probabilidade também, sendo que mais uma vez, a não aplicação do regulador apresentou o melhor resultado, Tabela 9, 2,2cm após 30 dias. Sommer et al (1975) conseguiram até 2cm de crescimento com aplicação de 5mg/l de BAP. Yeung et al (1981) observaram resultados de 0,3cm com 2,22 μ M (0,50mg/l) e 2,3cm de comprimento na

ausência do regulador. Thorpe (1988) obteve 0,6cm de comprimento na presença de 25 μ M (5,632mg/l) de BAP e 2,4cm de comprimento na ausência deste, após 30 dias. Thorpe (1990) conseguiu 2,4cm de crescimento, após 21 dias, sem a presença do regulador.

Tabela 9 - Valores médios de comprimento e diâmetro de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, da parte superior do embrião aos 30 dias, submetidos a dois níveis de reguladores de crescimento e uma testemunha, respectivamente (0; 0,5; 1,0 mg/l de BAP).

Fonte de variação	média	
	Comprimento (cm)	Diâmetro (cm)
0	2,2017 (A)	0,3658 (A)
0,5	1,6458 (B)	0,3800 (A)
1,0	1,4267 (C)	0,3733 (A)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

A análise da Tabela 19 (p. 37) para concentração do regulador de crescimento permite verificar que não há diferença significativa para TCR1, porém ocorre, a nível de 1% de probabilidade para TCR2, TCR3 e TCR4, sendo que em TCR2 e TCR3, a melhor concentração é de 2,5mg/l e zero de BAP para TCR4.

Estes últimos resultados podem ser explicados, segundo Ellis & Judd (1987), pelo estímulo causado pelo regulador de crescimento à produção de RUBP (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase), desencadeando processo de multiplicação celular, enquanto a ausência de regulador de crescimento permite as células se alongarem.

4.4. Efeito da interação meio de cultura e consistência

Em relação a interação dos meios de cultura utilizados e as consistências líquida ou gel, os resultados apresentados na Tabela 3 (p. 36) indicam valores significativos a nível de 1% de probabilidade para TCR1 e TCR2 e não significativos para TCR3.

O comprimento e o diâmetro da parte superior do embrião também sofreram influência da combinação destes dois fatores atuando conjuntamente, sendo que a Tabela 7 (p. 38) apresenta resultados de diferenças estatísticas a nível de 5% de probabilidade para o comprimento e 1% para o diâmetro. Já na Tabela 11 (p. 38), observa-se que essa diferença é a nível de 1% para o comprimento, após 90 dias, em meios de cultura e de 1% de probabilidade para 60 dias em meio de cultura.

Para o número de gemas produzidas e gemas maiores que 5mm, Tabela 15 (p. 39), apenas o NG apresentou diferença estatística a nível de 1% de probabilidade.

Em relação a parte superior das plântulas, a interação destes dois fatores pode causar dúvidas quando se observa a Tabela 19 (p. 37). Porém, em TCR1, TCR2 e TCR4 os valores são estatisticamente diferentes.

Para as fases de Ind1 e Ind2, Tabela 27 (p. 45), há diferenças estatísticas a 1% de probabilidade, sendo que para gemas maiores que 5mm, após 15 semanas de cultivo, o resultado estatístico é não significativo. Estes dados comprovam os resultados obtidos por Chu et al. (1993), Lal & Ahuja (1993) e Bhattacharya et al. (1994), em que os meios de cultura, quando utilizados nas consistências líquida e gel, apresentaram

resultados diferentes para peso, número de gemas e formação de raízes e gemas, respectivamente.

Os resultados obtidos para as partes superiores do embrião e das plântulas podem ter sofrido influência pela variação da composição do agar utilizado (Pochet et al., 1991) ou mesmo pela maior difusão de nutrientes em meio de cultura líquido (Von Arnold & Eriksson, 1984).

4.5. Efeito das interações da concentração do regulador de crescimento e os meios de cultura

Nos trabalhos realizados por Abdullah et al. (1985), Bermudez & Sommer (1987), Burns et al. (1991), Chesick et al (1991) e Ferriz et al. (1994) observaram que ocorre comportamento diferenciado em relação ao crescimento e o processo de indução de gemas, mediante a combinação entre o uso de reguladores de crescimento e meios de cultura. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 3 (p. 36), na qual esta combinação de fatores apresentaram variação estatística a nível de 1% de probabilidade para TCR1, TCR2 e TCR3.

Na Tabela 7 (p. 38) para comprimento dos explantes aos 30 dias e Tabela 11 (p. 38), comprimento aos 60 e 90 dias, os resultados também mostraram variações estatísticas.

Em relação a TCR1, TCR2, TCR3 e TCR4, Tabela 10 (p. 43), e Ind1-NG, Tabela 27 (p. 45), ocorrem variações estatísticas. Abdullah et al. (1985) observaram que altas concentrações de potássio podem favorecer a organogênese e a reorganização celular,

assim como a presença de cálcio. Nestes casos, baixas concentrações de BAP são exigidas, enquanto altas concentrações podem inibir a formação de gemas.

Burns et al. (1991) observaram que em concentrações de $111\mu\text{M}$ ($25,00\text{mg/l}$) e $222\mu\text{M}$ ($50,01\text{mg/l}$) de BAP, o meio de cultura GD produziu maior número de gemas por explantes, enquanto doses de $22,2\mu\text{M}$ ($5,0\text{mg/l}$), o meio PBS foi mais adequado, porém não faz referência este autor sobre as causas que levaram a esta variação.

No presente trabalho o meio de cultura GD, utilizado para a parte superior do embrião possui $6\mu\text{M}$ de potássio, enquanto o EE e o MS possuem $10\mu\text{M}$, indicando maior possibilidade de uso de doses baixas do regulador vegetal em GD e maiores doses no MS e EE. (Apêndice 2).

Ferriz et al (1994) identificaram que para doses de $5\mu\text{M}$ ($1,1265\text{mg/l}$) de BAP, o meio de cultura GD com baixas concentrações de sais, foi mais adequado na organogênese, assim como a concentração de amônia no meio de cultura MS na presença de níveis de $50\mu\text{M}$ ($11,265\text{mg/l}$) de BAP, inibiu o aparecimento de gemas adventícias.

Comparando-se os meios utilizados no ZX, meio derivado do GD não houve colocação de NH_4^+ , enquanto que, nos demais meios de cultura utilizados para explantes de embrião, de plântula, o MS é o que apresenta maiores quantidades deste íon. (Apêndice 1).

Bermudez & Sommer (1987) observaram que a ação das citocininas é mais eficiente em baixas quantidades e que a presença de doses altas de amônia (20mM) em meios de cultura, inibe o aparecimento de gemas adventícias.

4.6. Efeito da interação da concentração do regulador de crescimento e a consistência dos meios de cultura

Em relação a interação concentração dos reguladores de crescimento e a consistência do meio de cultura, Sommer & Bermudez (1987) identificaram que, para o processo de indução em meio líquido com uso de BAP, foi mais adequado do que em meio gel, e que, durante o processo de alongamento, o meio de cultura na forma gel foi mais eficiente, com o uso de 4,4 μ M (0,991 mg/l) de BAP. Na Tabela 15 (p. 60), porém, não foram identificadas estas variações, sendo que os resultados para NG e NG>5mm foram não significativos para estes explantes. Resultados não significativos também foram conseguidos para a parte superior de plântulas, Tabela 27 (p. 45), na Ind1-NG, Ind2-NG e NG > 5mm.

Chu et al. (1993) observaram maior ganho de peso em *Rosa chinensis* quando cultivadas em meio líquido em presença de BAP. A Tabela 3 (p. 36) apresenta para TCR1 e TCR2 valores significativos a 1% de probabilidade, confirmando os resultados de literatura, assim como os resultados da Tabela 19 (p. 37) para TCR2 e TCR3.

Em relação ao comprimento da parte superior do embrião, Tabela 7 (p. 38), apresentou valores significativos em termos estatísticos. Porém, não existe referências na literatura consultada sobre estas análises.

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu concluir que:

1 - Para o crescimento e desenvolvimento de explantes cotiledonares, em TCR, os meios de cultura mais adequados foram o Murashige & Skoog (1962 modificado (MS), Eeuwens (1976) modificado (EE) e ZX, na ausência de regulador de crescimento; em comprimento MS-modificado, ZX e Gresshoff & Doy (1972) modificado (GD) sem regulador de crescimento e consistência líquida; número de gemas, EE-modificado e MS-modificado, e consistência gel; número de gemas maiores que 5 mm, ZX e consistência gel com 0,5 ou 1,0 mg/l de BAP.

2 - Para o crescimento e desenvolvimento de explantes epicotiledonares, em TCR, o meio de cultura mais adequado foi ZX, na consistência líquida, e com 2,5 mg/l de BAP; em número de gemas, EE-modificado e MS-modificado; para número de gemas maiores que 5 mm, ZX e consistência líquida com 2,5 ou 5,0 mg/l de BAP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, A. A.; GRACE, J.; Regeneration of Calabrian pine from juvenile needles. **Plant Science**, v.53, p.147-155, 1987.

ABDULLAH, A. A.; GRACE, J.; YEOMAN, M. M. Rooting and establishment of Calabrian pine plantlets propagated *in vitro*; influence of growth substances, rooting medium and origin of explant. **The New Phytologist**, v.13, n.2, p.193-202, 1989.

ABDULLAH, A. A.; YEOMAN, M. M.; GRACE, J. *In vitro* adventitious shoot formation from embryonic and cotyledonary tissue of *Pinus brutia* Ten. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.5, p.35-44, 1985.

AMERSON, H.V.; FRAMPTON Jr., L.J.; McKEAND, S.E.; MOTT, R.L.; WEIR, R.J. Loblolly pine tissue culture. In: HENKE, R.R.; HUGHS, K.W.; CONSTANTIN, M.J.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p.43-55.

ARNOLD, S. von.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botanic**, v.59, p.870-874, 1981.

ARNOLD, S. von.; ERIKSSON, T. Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L.) Karst. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.3, p.257-264, 1984.

- BARRETT, C.; CASSELLS, A. C. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* cv. "Grand Slam" explants *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p.169-175, 1994.
- BERGMANN, B. A.; STOMP, A.M. Influence of taxonomic relatedness and medium composition on meristematic nodule and adventitious shoot formation in nine pine species. **Canadian Journal of Forestry Research**, v.22, p.750-755, 1991.
- BERMÚDEZ, P. P.; SOMMER, H. E. Factors affecting adventitious bud induction in *Pinus elliottii* (Engelm.) embryos cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.11, p.25-35, 1987.
- BHATTACHARYA, P.; DEY, S.; BHATTACHARYA, B. C. Use of low-cost gelling agents and support matrices for industrial scale plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.37, p.15-23, 1994.
- BIONDI, S.; THORPE, T.A. Growth regulator effects metabolite changes, and respiration during shoot initiation in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata*. **Botanical Gazette**, v.143, n.1, p.20-25, 1982.
- BONGA, J.M. Tissue culture techniques. In : BONGA, J.M.; DURZAN, D.J.,(Ed.). **Tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Pub,1985. p.4-35.
- BORNMAN C. Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies* *in vitro*. **Physiologi Plantarum**, v.57, p.5-16, 1983.

- BRONSON, M.R.; DIXON, R. K. In vitro plantlet formation from embryonic cotyledon of *Pinus elliottii* Engelm. In: NORTH AMERICAN FOREST BIOLOGY WORKSHOP 10^o, Vancouver, 1988. **Physiology and genetics of reforestation: proceedings**. Vancouver: University of British Columbia, 1988. p.261-267.
- BURNS, J. A.; SCHWARZ, O.J.; SCHLARBAUM, S.E. Multiple shoot production from seedlings explants of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.). **Plant Cell Reports**, v.10 , p.439-443, 1991.
- CAPUANA, M. Le colture "in vitro" nel genere *Pinus*. **Monti e Boschi**, v.5, p.24-30, 1994.
- CHANG, S.; SEN, S.; MCKINLEY, C.R.; AIMERS H. J.; NEWTON, R.J. Clonal propagation of Virginia Pine (*Pinus virginiana* Mill.) by organogenesis. **Plant Cell Reports**, v.10, p.131-134, 1991.
- CHESICK, E.E.; MOHN, C.A.; HACKETT, W. P. Plantlet multiplication from white pine *Pinus strobus* L. embryos *in vitro*: bud induction and rooting. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, p.107-224, 1991.
- CHRISTIE, J.A. Micropropagation of *Pinus radiata*. **The Plant Propator**, v.30, n.3, p.9-11, 1984.
- CHRISTIE, J.A.; SINGH, P. A.; HORGAN, K.J. Explant developmental state and shoot formation in *Pinus radiata* cotyledons. **Botanical Gazette**, v.146, n.2, p.196-203, 1985.
- CHU, C.Y.; KNIGHT, S.L.; SMITH, M.A.L. Effect of liquid culture on the growth and development of miniature rose (*Rosa chinenses* Jacq. "Minima"). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 32, p.329-334, 1993.

- DAVID, A. In vitro propagation of gymnosperm. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J.(Ed.). **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Pub., 1985. p.72-108.
- DAVID, A.; DAVID, H.; MATEILLE, T. *In vitro* adventitious budding on *Pinus pinaster* cotyledons and needles. **Physiologia Plantarum**, v.56, p.102-107, 1982.
- DURZAN, D.J. Nitrogen metabolism and vegetative propagation of forest trees. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Pub., 1985. p.256-354.
- EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature Coconut Palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.36, p.23-28, 1976.
- ELLIS, D.D.; JUDD, R.C. SDS-PAGE - analysis of bud-forming cotyledons of *Pinus ponderosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 11, p.57-65, 1987.
- FÉRRIZ, L.G.; SERRANO, L.; PARDOS, J. A. *In vitro* shoot organogenesis from excised immature cotyledons and microcutting production in Stone Pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p.135-140, 1994.
- FRANCO, E.O.; SCHWARZ, O.J. Micropropagation of two tropical conifers: *Pinus oocarpa* Schiede and *Cupressus lusitanica* Miller. In: HENKE, R.J.R.; HUGHES, K.W.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p.195-211.
- GO, N.E.; PEREZ O.G.D.; HALOS, S.C. In vitro response of embryos from different provenances of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Morelet. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.1-7, 1993.

- GRESSHOFF, P.M.; DOY, C.H. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomate). **Planta**, v.107, p.161-170, 1972.
- GRONROOS, R.; ARNOLD, S.von. Initiation of roots on hypocotyl cuttings of *Pinus contorta in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.69, p.227-236, 1987.
- GUPTA, P.K.; DURZAN, D.J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziessi*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). **Plant Cell Repot**, v.4, p.177-179, 1985.
- HALOS, S.C.; GO, N. E. Micropropagation of *Pinus caribaea* Morelet. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.47-53, 1993.
- HARRY, I.S.; THORPE, T.A. Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of jack pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.37, p. 159-164, 1994.
- HORGAN, K.; AITKEN, J. Reliable plantlet formation from embryos and *seedlingss* shoot tips of radiata pine. **Physiologia Plantarum**, v.53, p.170-175, 1981.
- JAIN, M.; DONG, N.; NEWTON, R.J. Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii*) from immature embryos cultured *in vitro*. **Plant Science**, v.65, p.233-241, 1989.
- JANG, J.C.; TAINTER, F.H. Micropropagation of shortleaf, Virginia and loblolly x shortleaf pine hybrids via organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.25, p.61-67, 1991.
- KAUL, KARAN. Plant regeneration from cotyledon-hypocotyl explants of *Pinus strobus* L. **Plant Cell Reports**, v.7, p.5-6, 1987.

- KNEIJEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.139-144, 1992.
- KUMAR, P.P.; BENDER, L.; THORPE, T. A. Activities of ribulose biphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase and ^{14}C -bicarbonate fixation during *in vitro* culture of *Pinus radiata* cotyledons. **Plant Physiology**, v.87, p.675-679, 1988.
- LAL, N.; AHUJA, P. S. Assessment of liquid culture procedures for *in vitro* propagation of *Rheum emodi*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.34, p.223-226, 1993.
- LAMBARDI, M.; SHARMA, K.K.; THORPE, T.A. *In vitro* regeneration of shoot buds and plantlet formation from mature embryos of *Pinus halepensis* Mill. **Acta Horticulturae**, v.289, p.123-125, 1991.
- LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WAITS, W.M. Effect of combinations of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.153-160, 1992.
- LEIFERT, C.; WAITES, B.; KEETLEY, J.W.; WRIGHT S. M.; NICHOLAS, J.R. Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminants in *Delphinium* tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p.149-155, 1994.
- LESNEY, M.S. Growth responses and lignin production in cell suspensions of *Pinus elliottii* "elicited" by chitin, chitosan and mycelium of *Cronartium quercum* f. sp. *fusiforme*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.19, p.23-31, 1989.

- LESNEY, M.S.; JOHNSON, J.D.; KORHNAK, T. *In vitro* manipulation of slash pine of (*Pinus elliottii*). In: HANOVER, J.W., KEATHLEY, D.E. (Ed.). **Genetic manipulation of woody plants**. New York: Plenum Press, 1988. p.43-55.
- LINSMAIER, E.M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. **Physiology Plant**, v.18, p. 100-127, 1965.
- LITVAY, J.D.; VERMA, D.C.; JOHNSON, M.A. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda*) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota*). **Plant Cell Report**, v.4, p.325-328, 1985.
- MAZARI, A.; CAMM, E.L. Effect of cytokinins on plastid development and photosynthetic polypeptides during organogenesis of *Pinus ponderosa* Dougl. cotyledons cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, p.81-89, 1993.
- McKEAND, S.E.; ALLEN, H.L. Nutritional and root development factors affecting growth of tissue culture plantlets of loblolly pine. **Physiologia Plantarum**, v.61, p.523-528, 1984.
- MOTT, R. L.; AMERSON, H.V. A tissue culture process for the clonal production of loblolly pine plantlets. North Carolina Agriculture Resurce Service Technology Bulding. p. 271-275, 1981.
- MUDGE, K.W. Micropropagation of Mugo pine from embryonic and *seedlingss* explants. **HortScience**, v.21, n.2, p.298-299, 1986.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revisid medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

- PATEL, H.; THORPE, T.A. Histochemical examination of shoot initiation in culture cotyledon explants of radiata pine. **Botanical Gazette.**, v.145, n.3, p.312-322, 1984.
- PERALTA L.M.C.; SÁNCHEZ C. I. Micropropagation on conifer species. **Acta Horticulturae**, v.289, p.129-130, 1991.
- POCHET, B.; SCOMAN, V.; MESTDAGH, M.M.; MOREAU, B.; ANDRE, P. Influence of agar gel properties on the *in vitro* micropropagation of different clones of *Thuja plicata*. **Plant Cell Reports**, v.10, p.406-409, 1991.
- PULIDO, C.M. Induccion de organogenesis en cotiledones de Pine canariensi. **Suelo y Planta**, v.2, p.385-394, 1992.
- PULIDO, C.M. Effect of various bud induction treatments on elongation and rooting of adventitious shoots of Canary Island pine (*Pine canariensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.39, p.225-230, 1994.
- PULIDO, C.M.; HARRY, I.S.; THORPE, T.A. *In vitro* regeneration of plantlets of Canary Island pine *Pinus canariensis*. **Canadian Journal of Forestry Research**, v.20, p.1200-1211, 1990.
- PULIDO, C.M.; HARRY, I. S.; THORPE, T.A. Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.247-255, 1992.
- QUOIRIM, M.; LE POIVRE, P. Etudes de milieux adaptes aux cultures in vitro de *Prunus*. **Acta.Horticulture**, v.78, p.437-442, 1977.
- RANCILLAC, M.; FAYE, M.; DAVID, A. *In vitro* rooting of cloned shoots in *Pinus pinaster*. **Physiologia Plantarum**, v.56, n.97-101, 1982.

- REILLY, K.J.; WASHER, J. Vegetative propagation of radiata pine by tissue culture: Plantlet formations from embryonic tissue. **New Zeland Journal Forestry Science**, v.7, p.199-206, 1977.
- SARACITZ, C. H.; BLAZIACH, F.A.; AMERSON, H. V. *In vitro* propagation of Virginia Pine from cotyledons. **Journal of the American for Society for Horticultural Science**, v.116, n.2, p.362-365, 1991.
- SCHWARZ, O.J.; SCHLARBAUM, S.E.; BEATY, R.M. Plantlet regeneration from mature zygotic embryos of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). **Plant Cell Reports**, v.7, p.174-177, 1988.
- SHARP, W. R. New Horizon in the improvement of plants. In: CRÓCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. (Ed.). **Biotecnologia para produção vegetal**. Piracicaba: CEBETEC/FEALQ, 1991. p.1-4.
- SKHENK, R.V.; HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonus plant cell cultures. **Canadian Journal of Botanic**. v.50, p.199-204, 1972.
- SKIDMORE, D.I.; SIMONS, A.J.; BEDI, S. *In vitro* culture of shoots of *Pinus caribaea* on a liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.14, p.129-136, 1988.
- SOMMER, H. E.; BROWN, C.L.; KARMANIK, P. P. Differentation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustres* Mill.) tissue cultured *in vitro*. **Botanical Gazette**, v.132, n.2, p.106-200, 1975.
- THORPE, T.A. Organogenesis: structural, physiological and biochemical aspects. In: RODRIGUEZ R. (Ed.). **Plant aging - basic and applied approaches**. New York: Plenum Press, 1990. p. 191-197.

- THORPE, T.A. Physiology of bud induction in conifers *in vitro*. In: HANOVER, J.W. e KEATHLEY, D.E. (Ed.). **Genetic manipulation of woody plants**. New York : Plenum Press, 1988. p.43-55.
- TRANVAN, H.; TROTON, D.; CALVAYRAC, R. Morphological, histological and lipid changes during adventitious budding in *Pinus pinaster* cultured cotyledons. **Journal of Experimental Botany**, v.39, n.204, p.907-915, 1988.
- TYNAN, J.L.; CONNER, A.J.; MACKNIGHT, R.C.; POULTER, R.T.M. Miconazole: an effective antifungal agent for plant culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.293-301, 1993.
- VILLALOBOS, V.M.; THORPE, R.A.; YEUNG, E.C. Aplicacions del cultivo de tejidos em especies forestales. **Ciencia y Desarrollo**, v.51, p.43-49, 1983.
- VILLALOBOS, V.W.; OLIVER, M.J.; YEUNG, E.C.; THORPE, T.A. Cytokinin-induced switch in development in excised cotyledons of radiata pine cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.61, p.483-489, 1984.
- WEBB, DAVID T.; FLINN, BARRY S.; GEORGIS, WANDA. Micropropagation of eastern white pine *Pinus strobus* L. **Canadian Journal of Forest Research**, v.18, p.1570-1580, 1988.
- YEUNG, E.C.; AITKEN, J.; BIONDI, S.; THORPE, T. A. Shoot histogenesis in cotyledon explants of radiata pine. **Botanical Gazette**, v.142, n.4, p.494-501, 1981.
- YOUNG, P.M.; HUTCHENS, A.S.; CANFIELD, M.L. Use of antibiotics to control bacterial in shoot cultures of woody plants. **Plant Science Letters**, v.34, p.203-209, 1984.
- ZEL, J.; GOGALA, N.; CAMLOH, M. Micropropagation of *Pinus sylvestris*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.14, p.169-175, 1988.

ANEXOS

Tabela 4 - Valores médios da taxa de crescimento relativo, (TCR₁, TCR₂ e TCR₃) da parte superior do embrião de *Pinus elliotii* var. *elliottii*, mantidos em quatro diferentes meios de cultura.

Fonte de variação	média		
	TCR ₁	TCR ₂	TCR ₃
MS-cotil	11,169 (A)	1,589 (A)	0,971 (B)
EE-cotil	10,614 (A)	1,687 (A)	1,394 (A)
ZX-cotil	9,707 (B)	1,590 (A)	1,354 (A)
GD-cotil	9,679 (B)	1,314 (B)	1,488 (A)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

TCR 1, 2 e 3 - Taxa de crescimento relativo 1, 2 e 3.

Tabela 8 - Valores médios de comprimento e diâmetro de *Pinus elliotii* var. *elliottii*, da parte superior do embrião aos 30 dias, na fase de TCR₁, submetidos a quatro meios de cultura ZX-cotil, MS-cotil, GD-cotil e EE-cotil.

Fonte de variação	média	
	comprimento (cm)	diâmetro (cm)
MS-cotil	2,2633 (A)	0,3578 (B)
ZX-cotil	1,9633 (B)	0,4433 (A)
GD-cotil	1,7944 (B)	0,3244 (B)
EE-cotil	1,0111 (C)	0,3667 (B)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Tabela 12 - Valores médios do comprimento da parte superior do embrião de *Pinus elliotii* var. *elliottii* tomados aos 60 dias em quatro diferentes meios de cultura (EE-cotil, MS-cotil, GD-cotil e ZX-cotil).

Fonte de variação	Média
	Comprimento (cm) - 60 dias
ZX-cotil	4,173 (A)
GD-cotil	4,000 (A)
MS-cotil	3,357 (B)
EE-cotil	1,523 (C)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Tabela 13 - Valores médios do comprimento da parte superior do embrião de *Pinus elliottii* var. *elliottii* tomados aos 90 dias em quatro diferentes meios de cultura (EE-cotil, MS-cotil, GD-cotil e ZX-cotil).

Fonte de variação	Média
	Comprimento (cm) - 90 dias
ZX-cotil	5,850 (A)
GD-cotil	5,603 (A)
MS-cotil	4,063 (B)
EE-cotil	1,990 (C)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Tabela 14 - Valores médios do comprimento da parte superior do embrião de *Pinus elliottii* var. *elliottii* tomados aos 60 e 90 dias em duas consistências de meio de cultura (gel e líquida).

Fonte de variação	média	
	Comprimento - 60 dias	Comprimento - 90 dias
Líquida	3,550 (A)	4,837 (A)
Gel	2,977 (B)	3,917 (B)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Tabela 16 - Valores médios de NG após 30 dias e NG > 5 de *Pinus elliottii* var. *elliottii* após 15 semanas em meio de cultura EE-cotil, MS-cotil, ZX-cotil e GD-cotil.

Fonte de variação	Média	
	NG	NG > 5 mm
EE-cotil	2,800 (A)	7,750 (B)
MS-cotil	2,483 (A)	7,083 (B)
ZX-cotil	2,017 (B)	6,617 (A)
GD-cotil	1,483 (C)	6,533 (B)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

NG: classe de gemas; NG > 5 mm = número de gemas maiores que 5 mm.

Tabela 17 - Valores médios de NG e NG > 5 de *Pinus elliottii* var. *elliottii* após 15 semanas em cultura, originárias de meios com concentração de 0,5 mg/l e 1,0 mg/l de BAP.

Fonte de variação	Média	
	NG	NG > 5 mm
0,5 mg de BAP	2,208 (A)	7,183 (A)
1,0 mg de BAP	2,183 (A)	6,808 (A)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

NG: classe de gemas

NG > 5 mm = número de gemas maiores que 5 mm.

Tabela 21 - Valores médios da T.C.R. da parte superior das plântulas ou *seedlings*. de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, em três diferentes concentrações de hormônios (0; 2,5 e 5,0 mg/l de BAP).

Fonte de variação	médias			
	TCR1	TCR2	TCR3	TCR4
0,0	1,7945 (A)	1,0378 (B)	0,9084 (A)	0,8277 (A)
2,5	1,8305 (A)	1,1114 (A)	0,9875 (A)	0,7505 (B)
5,0	1,6993 (A)	0,9600 (B)	0,7540 (B)	0,5876 (C)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

TCR 1, 2, 3, 4 = Taxa de crescimento relativo 1, 2, 3 e 4.

Tabela 22 - Valores médios da T.C.R. da parte superior das plântulas ou *seedlings*. de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, após as fases TCR₁, TCR₂, TCR₃ e TCR₄, em diferentes meios de cultura.

Fonte de Variação	médias			
	TCR ₁	TCR ₂	TCR ₃	TCR ₄
ZX-A	1,875 (B)	1,4631 (A)	1,2475 (A)	1,0477 (A)
MS-A	23,93 (A)	0,8486 (C)	0,9157 (B)	0,6970 (B)
GD-A	1,4623 (C)	0,6718 (D)	0,5922 (D)	0,5405 (C)
EE-A	1,3716 (C)	1,1599 (B)	0,7774 (C)	0,6024 (C)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

TCR 1, 2, 3, 4 = Taxa de crescimento relativo 1, 2, 3 e 4.

Tabela 24 - Valores médios para NG da parte superior das plântulas ou *seedlings* de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, mantidos em quatro diferentes meios de cultura, nas fases de Ind.1 e Ind.2.

Fonte de variação	médias	
	Ind.1 - NG	Ind.2 - NG
EE-A	1,633 (A)	2,317 (A)
MS-A	1,617 (A)	2,20 (A)
ZX-A	1,567 (B)	2,367 (A)
GD-A	1,333 (B)	1,667 (B)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Ind.1 - NG - classe de gemas na fase de Ind. 1

Ind.2 - NG - classe de gemas na fase de Ind. 2

Tabela 25 - Valores médios para alongamento de gemas (maiores que 5 mm) da parte superior das plântulas ou *seedlings* de *P. elliottii* var. *elliottii* mantidos em quatro diferentes meios de cultura.

Fonte de variação	médias
	15 semanas - NG > 5 mm
ZX-A	8,467 (A)
GD-A	6,567 (B)
MS-A	6,133 (B)
EE-A	5,683 (B)

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a $p = 0,05$.

NG > 5 mm = número de gemas maior que 5 mm após 15 semanas

Figura 2 - Parte superior do embrião de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, em meio de cultura GD líquido com 0,5 mg/l de BAP.

Figura 3 - Parte superior do embrião de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, com 20 dias em meio de cultura GD-gel sem reguladores de crescimento.

Figura 4 - Parte superior do embrião de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, com 20 dias em meio de cultura GD-gel com 0,5 mg/l de BAP.

Figura 5 - Parte superior de plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, com 20 dias em meio de cultura GD-gel sem reguladores de crescimento.

Figura 6 - Parte superior de plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, com 20 dias em meio de cultura GD-gel com 2,5 mg/l de BAP.

Figura 7 - Parte superior de plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, com 20 dias em meio de cultura GD-gel com 5,0 mg/l de BAP.

APÊNDICES

Apêndice 1. Análise dos meios de cultura EE, GD e MS, com as devidas concentrações das soluções nutritivas, molaridade e distribuições primárias dos elementos.

Solução Nutritiva	Elemento Químico			Molaridade			Distribuição Primária dos Elementos em %		
	EE ORI	GD ORI	MS ORI	EE ORI	GD ORI	MS ORI	EE ORI	GD ORI	MS ORI
		mg/l							
NH ₄ NO ₃	0	1.000	1650	0,02	0,024435952	0,039423999	97,9	99,1	98,5
NH ₄ Cl	535	0	0				1,6	0,6	0,8
							com K	com Ca	com K
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0	241,2	0	0,002260706	0,002204424	0,001249173	0,4	0,2	0,6
							com K	com Ca	com K
CaCl ₂ ·2H ₂ O	294	0	440				3,3	2,5	5,2
							com Mg	com Ca	com Mg
KNO ₃	2.020	1.000	1.900				2,1	0,2	3,5
							com Na	com Mn	com Fe ₂
KH ₂ PO ₄	0	300	170	0,001128273	0,000175702	0,001731703	-	-	0,4
							com Fe ₂	com H	com Fe ₂
KCl	1492	65	0				90,1	95,6	88,0
							com H	com K	com K
KI	8,3	0,8	0,83				80,1	89,7	81,0
							11,6	5,0	6,0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	312	0	0				5,0	4,8	8,8
							com Ca	com Mg	com Mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	247	17,099*	370				2,1	0,3	3,8
							com Na	com Mn	com Fe ₂
							1,0	0,1	-
							-	-	0,2
							com Fe ₂	com H	com Fe ₂
							98,2	99,3	98,7
							1,3	0,5	0,7
							0,3	0,2	0,5
							0,1	-	0,2
							com Na	com Na	com Na
							0,1	-	-
							100,0	100,0	100,0
							4,6	5,5	2,7
							91,6	93,9	93,3
							3,8	0,5	4,0
							-	0,1	-
							99,9	99,9	99,9
							-	100,0	99,9
							100,0	-	-
							100,0	-	-
							100,0	-	-
							100,0	-	-
							2,2	3,9	0,7
							31,9	3,8	26,3
							25,1	1,0	30,2
							1,0	0,1	0,1
							1,0	0,1	0,1
							38,6	91,0	42,9
							97,5	98,5	97,5
							0,8	1,1	1,7
							0,2	0,3	0,1
							0,4	-	0,6
							1,1	-	0,2

Cont. (Apêndice 1)

Solução Nutritiva		EE ORI	GD ORI	MS ORI	Elemento Químico	EE ORI	GD ORI	MS ORI	Distribuição Primária dos Elementos em %				
		mg/l				Molaridade							
Glicina		0	4	1,89	Ca ⁽⁺²⁾	0,001999592	0,001021385	0,002992587	Metal Livre	84,9	87,6	84,1	
Arginina		100	0	0		com NO ₃				com NO ₃	3,6	5,8	7,7
Asparagina		100	0	0		com PO ₄				com PO ₄	3,7	5,2	2,2
		100	0	0		com SO ₄				com SO ₄	2,8	0,8	5,1
		100	0	0		com Cl				com Cl	4,8	0,2	0,9
Glutamina		100	0	0					com EDTA	0,1	0,4	-	
Mesoinositol		100	10	100	Mg ⁽⁺²⁾	0,0010020028	6,93671.10 ⁻⁵	0,001501014	Metal Livre	88,2	91,1	90,3	
Tiamina HCl		0,5	1	0,1		com NO ₃				com NO ₃	0,8	1,3	1,7
Adenina Hemissulfato						com PO ₄				com PO ₄	4,7	6,8	2,9
									com SO ₄	2,3	0,7	4,3	
									com Cl	4,0	0,1	0,8	
Piridoxina		0,05	0,10	0,5	Na ⁽⁺⁾	0,002463098	0,000200346	0,000202206	Metal Livre	97,2	99,1	98,1	
Biotina		0,05	0,2			com NO ₃				com NO ₃	0,3	0,5	0,7
Ac. Nicotínico		0,05	0,1	0,5		com PO ₄				com PO ₄	0,2	0,3	0,1
Pentatonato de Ca ⁺		0,05				com SO ₄				com SO ₄	0,5	0,1	0,8
									com Cl	1,7	-	0,3	
Sacarose g/l		30	30	30	Mn ⁽⁺²⁾	5,02107.10 ⁻⁵	4,4831.10 ⁻⁶	9,99731.10 ⁻⁵	Metal Livre	30,4	12,2	63,0	
Agar g/l		6,0	6,0	6,0		com NO ₃				com NO ₃	0,4	0,3	2,0
pH						com PO ₄				com PO ₄	4,0	2,3	5,0
						com SO ₄				com SO ₄	1,0	0,1	3,8
						com EDTA				com EDTA	63,7	85,1	26,1
									com Cl	0,4	-	0,1	
					Zn ⁽⁺²⁾	2,50383.10 ⁻⁵	1,04326.10 ⁻⁶	2,99068.10 ⁻⁵	com EDTA	100,0	100,0	100,0	
						com EDTA				com EDTA	100,0	100,0	100,0
						Metal Livre				Metal Livre	0,2	-	0,1
						com EDTA				com EDTA	99,8	99,9	98,9
						Metal Livre				Metal Livre	14,6	5,2	41,2
					Cu ⁽⁺²⁾	1,00124.10 ⁻⁶	1,00124.10 ⁻⁷	1,00124.10 ⁻⁷	com NO ₃	0,2	0,1	1,2	
						com PO ₄				com PO ₄	7,5	3,7	12,6
						com SO ₄				com SO ₄	0,4	-	2,0
						com EDTA				com EDTA	77,0	91,0	42,9
						com Cl				com Cl	0,2	-	-
					Fe ⁽⁺²⁾	4,99946.10 ⁻⁵	0,000100709	0,000100709	com EDTA	100,0	-	-	
						com EDTA				com EDTA	100,0	-	-
					Ni ⁽⁺²⁾								
					H ⁽⁺⁾	0,0046718	0,004423401	0,002799123					
						0,059559039	0,027846461	0,048521537					
						0,060327176	0,031295262	0,048403894					
					TOT N	0,03	0,036928144	0,060036116					
					NH ₄ /N	0,34	0,34	0,2433					
					N/EI	0,125118	0,3122	0,3097					
					PO ₄ /EI ⁽⁺⁾	0,037957	0,07916	0,02574					
					K/EI ⁽⁺⁾	0,664102	0,4148	0,4145					

* Original: sulfato de magnésio 17,099 mg/l e sulfato de magnésio monohidratado a 1,0 mg/l.

Apêndice 2. Análise dos meios de cultura utilizada para explantes da parte superior de embriões de *Pinus elliottii* var *elliottii*, com as devidas concentrações das soluções nutritivas, , molaridade e distribuições primárias dos elementos.

Solução Nutritiva	mg/l				Elemento Químico	Molaridade				Distribuição Primária dos Elementos em %			
	ZX COTIL	EE COTIL	GD COTIL	MS COTIL		ZX COTIL	EE COTIL	GD COTIL	MS COTIL	ZX COTIL	EE COTIL	GD COTIL	MS COTIL
NH ₄ NO ₃	0	0	500	825	NO ₃ ⁽¹⁾	0,025802234	0,01	0,012217976	0,019711999	Lig. Livre com K	98,3	99,2	99,5
NH ₄ Cl	0	267	0	0						com K	1,0	0,5	0,3
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	708,48	0	120,6	0	PO ₄ ⁽³⁾	0,002204424	0,00130353	0,001102212	0,000624587	com Ca	0,6	0,3	0,2
										com K	2,4	1,2	0,8
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0	147	0	220						com Ca	5,8	2,5	,15
										com Mg	2,5	1,6	0,1
KNO ₃	2.000	1.010	500	950						com Na	0,1		
										com Mn	0,2		0,3
KH ₂ PO ₄	300	0	150	85	SO ₄ ⁽²⁾	0,00118773	0,000539182	8,75793.10 ⁻⁵	0,000865582	com Fe ₂	0,7	0,1	0,7
										com H	88,4	94,4	97,4
KCl	65	32,5	32,5	0						Lig. Livre com K	79,4	87,7	92,2
										com K	7,4	4,2	3,1
KI	0,8	0,415	0,4	0,415						com Ca	10,1	5,2	3,6
										com Mg	2,8		0,2
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0	156	0	0						com Na	2,1		
										com Mn	0,1		0,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	123,5	8,549	185	Cl ⁽¹⁾	0,000873999	0,007427305	0,000436054	0,000865582	Lig. Livre com K	98,5	99,2	99,6
										com K	0,8	0,4	0,3
										com Ca	0,5	0,2	0,1
										com Mg	0,1		0,1
H ₃ BO ₃	3	1,55	0,15	3,1	[⁽³⁾	4,81841.10 ⁻⁵	2,49955.10 ⁻⁵	2,4092.10 ⁻⁵	0,002992692	Lig. Livre	100,0	100,0	100,0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,25	0,12	0,0125	0,0125	MoO ₄ ⁽²⁾	1,03314.10 ⁻⁸	495909.10 ⁻⁷	5,16572.10 ⁻⁸	2,49955.10 ⁻⁵	Lig. Livre com Ca	2,4	4,9	7,4
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,25	0,125	0,0125	0,0125						Lig. Livre com Mg	94,9	91,3	91,9
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,3	13,9	18,65	18,625	NH ₃ (O)	0	0,004990654	0,006246096	5,16572.10 ⁻⁷	com H	2,7	3,7	0,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	28	0,012	13,925	13,925	GLIC ⁽¹⁾	5,32836.10 ⁻⁵	0	2,66418.10 ⁻⁵	1,25216.10 ⁻⁵	com H	99,9	99,9	99,9
MnSO ₄ ·4H ₂ O	12,8	5,6	0,5	11,15	ARG ⁽¹⁾	0	0,000287026	0	0	com H		100,0	100,0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,12	0,0125	0,125	ASP ⁽¹⁾	0	0,000374981	0	0	com H	100,0		
					GLUT ⁽³⁾	0	0,00034002	0	0	com H	100,0		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3	3,6	0,15	4,3	EDTA ⁽⁴⁾	0,000100204	3,73415.10 ⁻⁵	5,01021.10 ⁻⁵	0,010306059	com Ni	0,1		
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0	0,012	0	0						com Ca	1,5	7,8	3,6
										com Mn	24,3	55,3	3,8
										com Zn	10,5	33,9	1,0
										com Cu ₂ ⁺	5,0	1,3	0,1
										com Co ₂ ⁺	1,0	1,3	0,1
										com Fe ₂	57,7	0,1	91,4
										Metal Livre	98,2	98,9	99,2
										com NO ₃	1,1	0,6	0,6
										com PO ₄	0,1	0,1	0,1
										com SO ₄	0,2	0,2	0,3
										com Cl	0,4	0,3	0,1

Cont. (Apêndice 2)

Solução Nutritiva	Elemento Químico					Distribuição Primária dos Elementos em %				
	ZX COTIL	EE COTIL	GD COTIL	MS COTIL	mg/l	ZX COTIL	EE COTIL	GD COTIL	MS COTIL	MS COTIL
						Molaridade				
Glicina	4	0	2	0,94		Ca ⁽⁺²⁾	0,003000127	0,000999796	0,000510692	0,001496293
Arginina	0	50	0	0		Metal Livre				
Asparagina	0	50	0	0		com NO ₃				
Glutamina	0	50	0	0		com PO ₄				
						com SO ₄				
						com Cl				
						com EDTA				
Mesoinositol	10	50	5	5		Mg ⁽⁺²⁾	0,001014199	0,000501014	3,46815.10 ⁻⁵	0,000750507
Tiamina HCl	1	0,25		0,05		Metal Livre				
Adenina Hemissulfato						com NO ₃				
						com PO ₄				
						com SO ₄				
						com Cl				
						com EDTA				
						Na ⁽⁺⁾	0,000202475	0,001206028	0,000100307	0,000101103
						Metal Livre				
						com NO ₃				
						com PO ₄				
						com SO ₄				
						com Cl				
						Mn ⁽⁺²⁾	5,73837.10 ⁻⁵	2,51054.10 ⁻⁵	2,24155.10 ⁻⁵	4,99868.10 ⁻⁵
						Metal Livre				
						com NO ₃				
						com PO ₄				
						com SO ₄				
						com Cl				
						Zn ⁽⁺²⁾	1,04326.10 ⁻⁵	1,25191.10 ⁻⁵	5,2163.10 ⁻⁷	1,49534.10 ⁻⁵
						com EDTA				
						Cu ⁽⁺²⁾	5,00621.10 ⁻⁵	5,00621.10 ⁻⁷	5,00621.10 ⁻⁵	5,00621.10 ⁻⁵
						com EDTA				
						Co ⁽⁺²⁾	1,05084.10 ⁻⁵	5,04308.10 ⁻⁷	5,2532.10 ⁻⁸	5,2532.10 ⁻⁵
						Metal Livre				
						Fe ⁽⁺²⁾	0,000100709	4,31608.10 ⁻⁸	5,00845.10 ⁻⁵	5,00845.10 ⁻⁵
						Metal Livre				
						com NO ₃				
						com PO ₄				
						com SO ₄				
						com Cl				
						Ni ⁽⁺²⁾				
						H ⁽⁺⁾	0,004554384	0,0023359	0,0022117	0,001399561
						E ⁽⁺⁾	0,030227726	0,0201392	0,013923026	0,024260432
						E ⁽⁺⁾	0,031828886	0,0206105	0,015647493	0,024201677
						TOT N	0,025802234	0,0149906	0,018464072	0,030018058
						NH ₄ /N		0,3329177	0,3382837	0,3433286
						N/El	0,207892706	0,1843881	0,3122040	0,3097064
						PO ₄ /El ⁽⁺⁾	0,072927203	0,0561269	0,0791646	0,0257450
						K/El ⁽⁺⁾	0,71894190	0,5089316	0,4148309	0,414559

Os meios de cultura EE COTIL, GD COTIL, MS COTIL foram reduzidos a metade em suas concentrações em comparação aos meios de cultura originais (EE, GD e MS).

Apêndice 3. Análise dos meios de cultura utilizada para explantes da parte superior de plântulas de *Pinus elliottii* var *elliottii*, com as devidas concentrações das soluções nutritivas, molaridade e distribuições primárias dos elementos.

Solução Nutritiva	mg/l					Elemento Químico	Molaridade					Distribuição Primária dos Elementos em%				
	ZX A	EE A	GD A	MS A			ZX A	EE A	GD A	MS A		ZX A	EE A	GD A	MS A	
NH ₄ NO ₃	0	0	1.000	1650		NO ₃ ⁽⁻⁾	0,025602234	0,02	0,024434258	0,039423999	Lig. Livre com K	98,3	98,4	99,2	98,5	
NH ₄ Cl	0	134	0	0		PO ₄ ⁽⁻³⁾	0,002204424	0,002260706	0,002204424	0,002321559	com Ca com K	0,6	0,4	0,3	0,6	
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	708,48	0	241,2	0							com Ca	2,4	2,6	1,4	2,0	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0	294	0	440							com Mg com Na	2,5	2,4	0,2	1,7	
KNO ₃	2.000	2.020	1.000	1.900							com Mn com Fe ₂	0,2	0,3	-	0,3	
KH ₂ PO ₄	300	0	300	170		SO ₄ ⁽⁻²⁾	0,00118773	0,001128273	0,000175163	0,000936268	Lig. Livre com K	88,5	89,9	95,7	89,8	
KCl	65	372*	16,5*	0							com Ca	7,4	8,1	4,9	6,1	
KI	0,8	0,8*	0,8	0,83							com Mg com Na	10,1	6,5	5,0	9,1	
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0	312	0	148**		Cl ⁽⁻⁾	0,000873999	0,011496016	0,000221538	0,005965383	com Mn Lig. Livre com K	0,1	0,2	-	0,2	
MgSO ₄ .7H ₂ O	250	247	17.099	180,7*							com Mg com Ca	98,5	98,5	99,3	99,7	
											com Mg com Na	0,5	0,3	0,5	0,7	
											com Mg com Na	0,1	0,1	-	-	
H ₃ BO ₃	3	3,1	0,3	6,2		I ⁽⁻⁾	4,81841.10 ⁻⁶	4,81841.10 ⁻⁶	4,81841.10 ⁻⁶	4,9991.10 ⁻⁵	Lig. Livre	100,0	100,0	100,0	100,0	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,25	0,24	0,025	0,025		MoO ₄ ⁽⁻²⁾	1,03314.10 ⁻⁸	9,91818.10 ⁻⁷	1,033314.10 ⁻⁷	1,03314.10 ⁻⁶	Lig. Livre com Ca	2,4	3,6	5,4	2,7	
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,25	0,25	0,025	0,025							com Mg	94,9	92,5	94,0	95,3	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3		NH ₃ (O)	0	0,002504673	0,012492192	0,020612117	com H	2,7	3,8	0,5	1,9	
FeSO ₄ .7H ₂ O	28	14	28	27,8		GLIC ⁽⁻⁾	5,32836.10 ⁻⁵	0	5,32836.10 ⁻⁵	2,66418.10 ⁻⁵	com H	-	-	0,1	-	
MnSO ₄ .4H ₂ O	12,8	11,2	1	16,9*		ARG ⁽⁻⁾	0	0,000574053	0	0	com H	-	99,9	-	-	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,24	0,025	0,25		ASP ⁽⁻⁾	0	0,000749963	0	0	com Ni	-	0,8	-	-	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3	7,2	0,3	8,6*		GLUT ⁽⁻⁾	0	0,000680041	0	0	com Zn com H	-	0,2	-	-	
NiCl ₂ .6H ₂ O	0	0,024	0	0		EDTA ⁽⁻⁴⁾	0,000100204	0,000100204	0,000100204	0,000100204	com H	-	0,1	-	-	
											com Ni	-	99,8	-	-	
											com Ca	1,5	-	3,9	0,9	
											com Mn	24,2	-	3,8	23,4	
											com Zn	10,5	8,2	1,0	30,2	
											com Cu ₂	5,0	0,7	0,1	-	
											com Co ₂ ⁺	1,0	-	0,1	0,1	
											com Fe ₂	57,8	-	91,0	45,4	

Cont. (Apêndice 3)

Solução Nutritiva	mg/l					Distribuição Primária dos Elementos em %									
						Molaridade									
	ZX A	EE A	GD A	MS A	Elemento Químico	ZX A	EE A	GD A	MS A	ZX A	EE A	GD A	MS A		
Co ⁽⁺²⁾	1,05064.10 ⁻⁶	1,00862.10 ⁻⁶	1,05064.10 ⁻⁷	1,05064.10 ⁻⁷	Metal Livre	0,4	75,1	-	-	0,7	-	-	-		
	-	-	-	-	com NO ₃	-	1,2	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	com PO ₄	-	5,2	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	com SO ₄	-	4,0	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	com EDTA	99,5	-	-	-	99,9	-	-	99,2		
Fe ⁽⁺²⁾	-	-	-	-	com Cl	-	0,2	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	com ARG	-	0,3	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	com ASP	-	11,8	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	com GLUT	-	2,2	-	-	-	-	-	-		
	0,000100709	4,99946.10 ⁻⁵	0,000100169	9,99892.10 ⁻⁵	Metal Livre	26,0	61,4	-	-	5,2	-	-	33,4		
	-	-	-	-	com NO ₃	0,5	1,0	-	-	0,1	-	-	1,0		
	-	-	-	-	com PO ₄	14,7	35,0	-	-	3,7	-	-	19,3		
	-	-	-	-	com SO ₄	1,0	2,1	-	-	0,9	-	-	0,9		
	-	-	-	-	com EDTA	57,8	-	-	-	91,0	-	-	45,4		
	-	-	-	-	com Cl	-	0,3	-	-	-	-	-	-		
Ni ⁽⁺²⁾	-	-	-	-	com ASP	-	0,2	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	Metal Livre	-	2,2	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	com PO ₄	-	0,1	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	com EDTA	-	91,2	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	com ARG	-	0,1	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	com ASP	-	5,8	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	com GLUT	-	0,4	-	-	-	-	-	-		
H ⁽⁺⁾	0,004554384	0,0046718	0,004423401	0,004943895											
	0,030227726	0,036955065	0,027193792	0,048600087											
	0,031828886	0,037763202	0,030643574	0,050825886											
	0,025802234	0,022504673	0,03692645	0,060036116											
	-	0,11295682	0,338293301	0,343328629											
TOT N	-	-	-	-											
NH ₄ /N	-	-	-	-											
N/El	0,207892706	0,150516283	0,319226594	0,301307552											
PO ₄ /El ⁽⁺⁾	0,072927203	0,061108306	0,081063485	0,0407572854											
K/El ⁽⁺⁾	0,718941907	0,661881322	0,402419122	0,394799879											

* Quantidade usado foi alterada, conforme o original;
** Composto químico não existente no meio original.