REVERSÃO A JUVENILIDADE E CLONAGEM DE
Eucalyptus urophylla, S. T. BLAKE "IN VITRO"

ANTONIO NATAL GONÇALVES

Orientador: Prof. OTTO JESU CROCOMO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
- 1982 -

"Technic is the result of a need
new needs demand new technics
total control denial of
the accident
states of order
organic intensity
energy and motion
made visible
memories arrested in space,
human needs and motives
acceptance"

Jackson Pollock

"You have to take care not to write the law simply
and unimaginatively by itself but to put yourself
in motion around the law!"

Paul Klee

Para

RANDI e JONCLAIR

A G R A D E C I M E N T O S

- Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, pela orientação final;
- Ao Prof. Dr. Helládio do Amaral Mello, pela orientação inicial;
- Ao Prof. Dr. Hilton Thadeu Zarate do Couto, pela orientação no delineamento dos testes experimentais;
- Ao José Roberto Romanini, pela valiosa colaboração no desenvolvimento e avaliação dos testes experimentais;
- Aos Eng.^{os} Ftais. Petra Sylvia Roth e Fábio Spina França, pela ajuda na tabulação dos dados e edição desse trabalho;
- Ao Flávio Rodrigues Salgado, pela ajuda na elaboração das figuras;
- À Bibliotecária Marialice Metzker Poggiani, pela colaboração prestada;
- Ao IPEF - Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, pelo suporte financeiro para a manutenção do auxiliar de laboratório.

E a todos aqueles que de uma maneira ou outra colaboraram pela execução desse trabalho.

Í N D I C E

	Pág.
RESUMO	x
SUMMARY	xii
I - INTRODUÇÃO	1
II - REVISÃO DA LITERATURA	3
A - <i>Eucalyptus urophylla</i> S. T. Blake	3
B - Sistema de Gemas do <i>Eucalyptus</i>	4
C - Maturação em Plantas Lenhosas	5
1 - Características morfo-fisiológicas	5
2 - Considerações sobre a hereditariedade das células somáticas na maturação	6
3 - Mudanças nos ácidos nucleicos associadas à maturação	8
4 - Reversão à juvenilidade em meristemas apicais de plantas lenhosas	9
5 - Produção de calo de explantes de material juvenil, revertido à juvenilidade e adulto	10
D - Cultura de <i>Eucalyptus</i> em sistemas "in vitro"	11
1 - Cultura de calo e de suspensão de células	11
2 - Cultura de órgãos	11
3 - Clonagem de <i>Eucalyptus</i> "in vitro"	12

	Pág.
III - MATERIAIS E MÉTODOS	13
A - Testes Experimentais	13
1 - Estabelecimento comparativo de gemas ..	13
a - Os explantes e suas origens	15
b - Métodos de esterilização dos ex plantes	15
1) Método direto	18
2) Método indireto	18
3) Método semente	19
c - Avaliação	20
2 - Produção sucessiva comparativa de ge mas	20
a - Procedimentos da cultura de gemas ..	20
b - Avaliação	21
3 - Enraizamento comparativo de gemas	21
a - Procedimentos	21
b - Avaliação	23
4 - Produção comparativa de calo	23
a - Procedimento	23
b - Avaliação	23
B - Meio de Cultura	26
C - Condições Ambientais de Cultura	27
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
A - Testes Experimentais	29

	Pág.
1 - Estabelecimento da cultura de gemas	29
a - Método direto	29
1) Sobrevivência	29
2) Brotação	30
3) Contaminação por fungo	32
4) Contaminação por bactéria	32
5) Oxidação fenólica	33
b - Método indireto	33
1) Sobrevivência	35
2) Brotação	35
3) Contaminação por fungo	36
4) Contaminação por bactéria	36
5) Oxidação fenólica	37
c - Método sementes	38
d - Comparação dos métodos	38
2 - Produção sucessiva comparativa de gemas .	40
a - Comparação da produção sucessiva de gemas dentro do grupo de clo- nes A	40
b - Comparação da produção sucessiva de gemas dentro do grupo de clo- nes B	42
c - Comparação da produção sucessiva de gemas dentro do grupo de clo- nes C	42

d - Comparação da produção sucessiva de gemas dentro do clone EU1	43
e - Comparação da produção sucessiva de gemas entre grupos de clones e o clone EU1	43
3 - Enraizamento comparativo das gemas	44
a - Enraizamento comparativo das gemas dentro do grupo de clones A ...	44
b - Comparação do enraizamento de <u>ge</u> mas dentro do grupo de clones B ...	46
c - Comparação do enraizamento de <u>ge</u> mas dentro do grupo de clones C ...	47
d - Comparação do enraizamento de <u>ge</u> mas dentro do clone EU1	47
e - Comparação do enraizamento de <u>ge</u> mas entre grupos de clones e o clone EU1	48
4 - Produção comparativa de calo	48
a - Comparação da produção de calo dentro do grupo de clones A	49
1) Peso fresco	49
2) Taxa de crescimento do peso fresco	49
3) Peso seco	52
4) Taxa de crescimento do peso seco	52
5) Porcentagem de peso seco	52

	Pág.
b - Comparação da produção de calo dentro do grupo de clones B	53
1) Peso fresco	53
2) Taxa de crescimento do peso fresco	53
3) Peso seco	53
4) Taxa de crescimento do peso seco	54
5) Porcentagem de peso seco	54
c - Comparação da produção de calo dentro do grupo de clones C	54
1) Peso fresco	54
2) Taxa de crescimento do peso fresco	55
3) Peso seco	55
4) Taxa de crescimento do peso seco	55
5) Porcentagem de peso seco	55
d - Variação da produção de calo do clone EU1	56
e - Comparação da produção de calo entre os grupos de clones e o clone EU1	56
f - Comparação da produção de calo entre culturas	58
5 - Avaliação dos testes experimentais	59

B -	Proposição de um Sistema para Regulação da da Reversão à Juvenilidade e da Diferencia <u>a</u> ção e Desenvolvimento Celular	62
1 -	Ação dos reguladores de crescimento no metabolismo dos ácidos nucleicos	62
2 -	Modificações na biossíntese de ácidos nucleicos em sistemas diferenciados	63
3 -	Regulação da biossíntese de ribonucleo <u>o</u> tídeos	63
4 -	Regulação da biossíntese de deoxiribo- nucleotídeos	65
5 -	Fluxo de informações genéticas	67
6 -	Regulação da reversão à juvenilidade e da diferenciação e desenvolvimento celular	69
V -	CONCLUSÕES	71
VI -	LITERATURA CITADA	73
VII -	APÊNDICES	82

REVERSÃO À JUVENILIDADE E CLONAGEM DE *Eucalyptus*
urophylla S. T. BLAKE "in vitro"

Antonio Natal Gonçalves

Otto Jesu Crocomo
Orientador

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram: a reversão à juvenilidade e a clonagem "in vitro" de árvores de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake de diferentes idades e populações. Os resultados indicam que:

- a - Houve variação entre e dentro de grupos de clones de diferentes idades e procedências para a multiplicação e o enraizamento de gemas;
- b - a variação da temperatura média no período dos testes experimentais provocou variações mais intensas entre culturas do que entre grupos de clones;
- c - a taxa média de clonagem foi de $7,5 \times 10^{13}$ /ano;
- d - a multiplicação sucessiva de gemas com estímulo constante de 6 BAP (2 mg/l) foi eficiente na reversão à juvenilidade.

Baseado nos resultados, foi feita uma proposta para a regulação da hereditariedade das células somáticas onde: a hereditariedade das células somáticas é uma manifestação dos mecanismos alostéricos na regulação da biossíntese e no deslocamento das relações entre e dentro dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos, e na transcrição, processamento e tradução de informações genéticas na diferenciação e desenvolvimento celular.

REVERSION TO JUVENILITY AND CLONING OF *Eucalyptus*
urophylla S. T. BLAKE "in vitro"

Antonio Natal Gonçalves

Otto Jesu Crocomo
Adviser

SUMMARY

The objectives of this study were the reversion to juvenility and the cloning of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake trees from different populations and ages. By analysing the results of this study, the following conclusions were drawn:

- a - There were bud multiplication and rooting variation among and within groups of clones of different ages and provenances;
- b - average temperature during the period in which the experimental trials were carried out brought about more intense variations among the cultures than among groups of clones;
- c - average cloning rate was 7.5×10^{13} /year;
- d - successive bud multiplication with constant stimulus of 6 BAP (2 mg/l) was efficient for the reversion of adult trees to juvenility.

Based on the results obtained, a proposal was made for the regulation of somatic cell heredity where: the somatic cell heredity is a manifestation of the allosteric regulation mechanisms in the biosynthesis and in the shifts of the ratio between and within purine and pyrimidine nucleotides, and in the transcription, processing and translocation of genetic information in the cellular differentiation and development.

1 - INTRODUÇÃO

A clonagem de árvores superiores tem sido usada como instrumento nos programas de melhoramento florestal. Porém, o uso dos métodos clássicos de propagação vegetativa tem apresentado limitações, por exemplo, a incompatibilidade na enxertia, a restrição ao uso de material vegetativo juvenil no enraizamento de estacas, amontoas e alporques, e ainda apresentam baixas taxas de multiplicação.

O método alternativo para a clonagem de árvores é o uso das técnicas de cultura de células e de tecidos que apresentam altas taxas de multiplicação, não apresentam incompatibilidade, não se restringem ao uso de material vegetativo juvenil, exigem pouco espaço e apresentam economia de tempo.

Devido à algumas indefinições de método no uso da cultura de células e de tecidos e dos mecanismos que regu-

lam a maturação em árvores para efetivar a clonagem de árvores adultas, o presente trabalho teve como objetivos:

- A - Estabelecer a cultura de gemas de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake de árvores de diferentes populações genéticas e em diferentes idades.
- B - Produção sucessiva, enraizamento e produção de calo comparativos de gemas.
- C - Reversão de gemas adultas à juvenilidade.

II - REVISÃO DA LITERATURA

A - *Eucalyptus urophylla* S. T. BLAKE

A descrição botânica da espécie *E. urophylla* foi publicada na *Austrobaileya* 1:7 (1977). Este eucalipto é uma árvore com cerca de 55 m de altura, 2 m de diâmetro e com troncos retos até dois terços da altura da árvore. Nas altitudes maiores, as árvores podem ser baixas, retorcidas e com alguns metros de altura (TURNBULL e BROOKER, 1978).

A ocorrência da espécie é principalmente no Timor e nas ilhas de Flores, Adonara, Lomblen, Pantar, Alor e Wetar, da Indonésia. A faixa latitudinal da ocorrência é de 8°30' - 10° S e a altitudes de 350 a 2.960 m. Em Timor e abaixo de 1.500 m de altitude, a espécie pode ocorrer associada a *E. alba* que domina as áreas mais xéricas (TURNBULL e BROOKER, 1978).

Esta espécie foi inicialmente introduzida no Brasil, em Rio Claro, SP, no ano de 1919 com o nome de *E. alba*. A partir de então, tem sido intensamente utilizada nos programas de reflorestamento produzindo bons rendimentos e mostrando resistência ao cancro causado pelo fungo *Diaporthe cubensis* (HODGES e REIS, 1976 ; TOMAZELLO FILHO, 1976 e CAMPINHOS e IKEMORI, 1977).

Introduções recentes dessa espécie foram quase exclusivamente de Timor. No entanto, novas introduções de material genético de Timor e das Ilhas da Indonésia foram feitas a partir de 1977 (VIEIRA, 1980).

B - SISTEMA DE GEMAS DO *Eucalyptus*

Na axila de cada folha, originalmente existem uma gema pedunculada e duas gemas acessórias. A gema pedunculada torna-se visível imediatamente após o desenvolvimento da folha. Essas gemas pedunculadas por não terem proteção de escamas como as de muitas plantas, foram denominadas de gemas nuas (CAREY, 1930). As gemas nuas próximas às gemas apicais desenvolvem simultaneamente a estas dando origem aos ramos de primeira ordem. Contudo, as gemas nuas distantes das gemas apicais tem o desenvolvimento inibido e se desenvolvem após a remoção da dominância apical (JACOBS, 1935).

Sob as gemas nuas, nos tecidos da axila foliar, existem pontos de tecido meristemático capazes de diferenciação em gemas. Se as gemas nuas e/ou acessórias forem destruídas, o tecido meristemático acessório dará origem a novas gemas. Esse processo parece ser indeterminado (PENFOLD e WILLIS, 1961 ; CREMER, 1972 e PRYOR, 1975).

JACOBS (1950) discute o sistema de gemas do *Eucalyptus* e assinala que o conjunto de gemas nuas e acessórias seriam "proventíceas" e não adventíceas. Essas gemas seriam "proventíceas" pelo fato de terem origem definida e que o tecido meristemático acessório de cada folha acompanharia o crescimento cambial dando origem a um ou vários pontos de gemas dormentes ou epicormicas que podem se fundir na base dando origem a uma estrutura bulbosa, o nó epicôrmico.

C - MATURAÇÃO EM PLANTAS LENHOSAS

1 - CARACTERÍSTICAS MORFO-FISIOLÓGICAS

Durante o desenvolvimento ontogenético, os meristemas das plantas lenhosas podem sofrer mudança gradual ou abrupta no potencial genético do estágio juvenil para o adulto. Tais mudanças são frequentemente caracterizadas por marcantes diferenças fenotípicas. As principais diferenças fenotípicas entre os estágios juvenil e adulto do desenvolvimento

ontogenético das plantas lenhosas são: hábito de crescimento, vigor, filotaxia, forma e estrutura da folha, presença de espinhos, teor de leucoantocianinas, arquitetura da copa, anatomia do caule, capacidade para enraizar ou florescer e eficiência assimilatória.

As características dos estágios juvenil e adulto do desenvolvimento ontogenético de vários gêneros, por exemplo, *Pinus*, *Thuja*, *Juniperus*, *Chamaecyparis*, *Fagus*, *Quercus*, *Carya*, *Ulmus*, *Acacia*, *Fraxinus*, *Malus*, *Citrus*, *Hevea*, *Hedera* e *Eucalyptus*, foram claramente definidas na literatura (KOZLOWSKI, 1971).

TURNBULL e BROOKER (1978) descreveram as características das folhas dos estágios juvenil e adulto de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake.

2 - CONSIDERAÇÕES SOBRE A HEREDITARIEDADE DAS CÉLULAS SOMÁTICAS NA MATURAÇÃO

BRINK (1962) faz certas generalizações sobre a maturação em plantas e algumas destas são:

- a - A maturação ocorre em células somáticas e é uma característica inerente ao desenvolvimento de muitas espécies vegetais;
- b - As fases alternativas, em alguns casos, diferem drasticamente no fenótipo, mas a mudança de uma fase para outra deve envolver fenótipos transitórios;

- c - A mudança de uma fase para outra é uma resposta dirigida a um estímulo originado fora do meristema apical afetado;
- d - A maturação é reversível sob certas condições fisiológicas;
- e - Uma vez estabelecida, a fase de crescimento tende a ser constante sob propagação vegetativa contínua, mesmo na ausência do fator ambiental que a induziu;
- f - A frequência da maturação é maior do que aquela das características de mutações transmitidas pela germinação;
- g - A maturação é associada ao crescimento meristemático e não com a senescência dos meristemas apicais;
- h - A reversão da maturação, que invariavelmente ocorre durante a reprodução sexuada, não está diretamente controlada tanto pela meiose como pela fertilização, como um processo genético.

BRAUN (1969) destaca que contra-partidas da maturação, expressas de uma maneira ampla, são comuns tanto em animais como em vegetais. Esse fenômeno ilustra um aspecto geral da hereditariedade das células somáticas nas quais apesar das marcantes diferenças na expressão fenotípica, o genótipo permanece constante. A maturação parece, então, ser meramente uma manifestação de um problema maior do desenvolvimento e da diferenciação celular.

3 - MUDANÇAS NOS ÁCIDOS NUCLÉICOS ASSOCIADAS A MATURAÇÃO

MILLIKAN e GHOSH (1971) discutem mudanças significativas nos teores de ácidos nucleicos associadas à maturação em tecidos da folha de *Hedera helix*. O material do estágio juvenil tinha mais DNA que o do estágio adulto do desenvolvimento. Na maturação, o teor de RNA total diminuiu quantitativamente. Mudanças semelhantes foram encontradas no tRNA e no rRNA, sendo que a análise dos nucleotídeos sugere que as mudanças em ambos os tipos de RNA seriam responsáveis pelo processo da maturação. As diferenças qualitativas nos nucleotídeos foram na redução das fases purínicas, principalmente AMP, e no aumento das bases pirimidínicas, principalmente UMP, no material vegetativo do estágio adulto.

INGLE (1979) indica que o genoma de vegetais é dinâmico, e especialmente os genes do rRNA. A alta redundância dos genes do rRNA em muitas espécies tende a complicar o problema. Contudo, em sistemas já bem conhecidos, o nível de redundância gênica do rRNA parece estar correlacionado com, e possivelmente influenciar, a expressão fenotípica.

DOMONEY e TIMMIS (1980) estudaram a redundância gênica do rRNA em populações de *Hedera helix* com material juvenil e adulto através da determinação de DNA e da hibridização de rRNA com DNA. Seus resultados mostraram ampla variação na redundância gênica de rRNA em diferentes populações.

Nenhuma diferença consistente no número de genes de rRNA foi observada entre as plantas juvenis e adultas testadas. Pequenas diferenças entre o teor de genes de rRNA de plantas juvenis e adultas, entre gemas dormentes e folhas desenvolvidas foram encontradas, porém em sentidos contrários.

4 - REVERSÃO A JUVENILIDADE EM MERISTEMAS APICAIS DE PLANTAS LENHOSAS

A reversão à juvenilidade em meristemas apicais de plantas lenhosas foi descrita por BRIAN (1953) ; HESS (1959 , 1961 , 1962.a.b.c. , 1964 , 1965 e 1966) ; ROBBINS (1957.a.b , 1959 e 1960) ; MUZIK e CRUZADO (1958) ; SCURFIELD e MOORE (1958) ; TRIPPI (1963) ; CHALLENGER *et alii* (1964) ; LANGNER (1964) ; BOCHERT (1965) ; GIROUARD (1966 , 1967 e 1969) ; PATON *et alii* (1970) ; LIBBY e HOOD (1976) ; FRANCKET (1977 e 1980) e KLEINSCHMIT (1977).

Os métodos descritos e usados para a reversão à juvenilidade de meristemas apicais de plantas lenhosas são:

- a - Tratamento térmico, frio ou calor;
- b - Tratamento com raio X ;
- c - Aplicação de ácido giberélico;
- d - Propagação vegetativa sucessiva;
- e - Poda drástica ou poda de gemas apicais;

- f - Neodiferenciação de gemas;
- g - Apomixia e a meiose para células.

5 - PRODUÇÃO DE CALO DE EXPLANTES DE MATERIAL JUVENIL, REVERTIDO A JUVENILIDADE E ADULTO

STOUTMYER e BRITT (1963 , 1965 e 1969) e ROBINS e HERVEY (1970) estudaram a produção de calo de *Hedera helix* a partir de explantes de material revertido a juvenilidade adulto e de juvenil a partir de plântulas originadas das progênies do material adulto. Nos trabalhos, os autores usaram a subcultura sucessiva dos calos e os resultados mostraram que:

- a - Existe variação da taxa de crescimento dentro do clone , dentro e entre populações de clones;
- b - Existem efeitos da variação estacional na taxa de crescimento dos calos;
- c - O calo de origem juvenil é mais produtivo que aqueles de origem de material revertido e estes mais produtivos que aqueles de origem adulta;
- d - Os calos de origem juvenil são menos estáveis que os demais e produzem raízes mais prontamente que estes últimos.

D - CULTURA DE *Eucalyptus* EM SISTEMAS "IN VITRO"

1 - CULTURA DE CALO E DE SUSPENSÃO DE CÉLULAS

Vários autores, FINE (1960) ; JACQUIOT (1964); MARCAVILLACA e MONTALDI (1964) ; SUSSEX (1965) ; PITON (1969); FOSSARD (1972) ; LEE e FOSSARD (1974) ; GONÇALVES (1975) e GONÇALVES *et alii* (1977) estudaram a produção de calo e suspensão de célula de várias espécies de *Eucalyptus* a partir de diferentes explantes e em diferentes meios de cultura com objetivos diversos.

2 - CULTURA DE ÓRGÃOS

BACHELARD e STOWE (1963) tentaram cultivar raiz de *Eucalyptus* em diferentes meios de cultura e não obtiveram sucesso.

BACHELARD (1969) estudou o desenvolvimento de gemas epicôrmicas de *E. polianthemos* em explantes nodais em diferentes meios de cultura e observou a existência de efeito da origem do explante e do regime de temperatura 21 / 17°C na redução da produção de gemas.

3 - CLONAGEM DE *Eucalyptus* "IN VITRO"

O primeiro trabalho que relatou sucesso na regeneração de plantas de eucalipto através do uso das técnicas da cultura de célula e de tecido foi de ANEJA e ATAL (1969) usando explantes de "lignotuber" de *E. citriodora*.

BLAKE (1972), também usando explantes de "lignotuber" de *E. obliqua* e de *E. viminalis* observou a produção de massas teratomáceas produzindo gemas e raízes que podiam ser subcultivadas e produziram plantas inteiras. WINTON (1972) não obteve sucesso usando a mesma técnica para *E. nova anglica*.

KITAHARA e CALDAS (1975) obtiveram gemas e raízes a partir de calos provenientes de explantes de hipocótilo de *E. alba*.

CRESSWELL e FOSSARD (1974) e FOSSARD *et alii* (1974) obtiveram clones de *E. grandis* a partir de explantes nodais.

GONÇALVES (1975) obteve clones a partir de explantes nodais de material juvenil e adulto de *E. grandis* e de material adulto de *E. robusta* e de *E. camaldulensis*.

Usando metodologia diferente para a reversão à juvenilidade de material adulto in vitro, GONÇALVES (1980) obteve clones de *E. urophylla* e GUPTA *et alii* (1981) obteve clones de *E. citriodora*.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

A - TESTES EXPERIMENTAIS

Os testes experimentais empregados neste trabalho foram: a) estabelecimento da cultura de gemas ; b) produção sucessiva de gemas ; c) enraizamento de gemas e d) produção de calo.

O procedimento experimental pode ser visualizado através da Figura 1.

1 - Estabelecimento Comparativo da Cultura de Gemas

Para o estabelecimento da cultura de gemas foram usados diferentes explantes de diferentes origens e métodos de esterilização de explantes.

FIGURA 1 - Esquema dos testes experimentais usados para o estabelecimento da cultura, a produção, o enraizamento e a produção de calo de gemas.

a - Os explantes e suas origens

Os explantes usados nos testes experimentais para o estabelecimento da cultura de gemas foram originados de sementes, segmentos nodais de ramos de crescimento do ano da copa das árvores e de gemas oriundas de ramos cultivados em casa de vegetação.

Os explantes foram oriundos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake de diferentes procedências e em diferentes idades, conforme mostra a Tabela 1.

Os clones procedentes de sementes foram denominados de clones A. Enquanto os clones de árvores de cerca de 1 ano de idade foram denominados de clones B, os clones de árvores com cerca de 4 anos de idade de clones C e os clones de árvores com cerca de 13 anos de idade de clones D.

O número de explantes utilizados para os diferentes clones e métodos de esterização para o estabelecimento da cultura de gemas constam na Tabela 2.

b - Métodos de Esterilização dos Explantes

Para a esterilização dos explantes foram utilizados os seguintes métodos: 1) método direto; 2) método indireto e 3) método semente.

TABELA 1 - Idades e origens das árvores de *Eucalyptus urophylla*
S. T. Blake usadas nos testes experimentais.

Idade	Arvores	Nº de árvores	Procedência				
			Local	Região	Lote de Semente	Local	Altitude (m)
A *	Semente	(1 - 94)	Várias	Flores		IPEF AN-31	---
B **	1 ano	B 01	05	Timor	Fatsunam	9°43' S	123°53' E
	aprox- ximada	B 02	17	Flores	Levotobi	8°31' S	122°46' E
		B 03	24	Lambiem	Ileape	8°18' S	123°50' E
	mente	B 04	09	Timor	Leigama	9°42' S	126°56' E
		B 05	08	Timor	Fatumnasi	9°39' S	124°13' E
C *	4 anos	C 01	Várias	Timor	Bessi-Lao (Remexio)	Ca 8°37' S	Ca 125°38' E
	aprox- mada -	C 02	Várias	Timor	Bessi-Lao (Remexio)	Ca 8°37' S	Ca 125°38' E
	mente	C 03	Várias	Timor	Bessi-Lao (Remexio)	Ca 8°37' S	Ca 125°38' E
		C 04	Várias	Timor	Bessi-Lao (Remexio)	Ca 8°37' S	Ca 125°38' E
		C 05	Várias	Timor	Bessi-Lao (Remexio)	Ca 8°37' S	Ca 125°38' E
D ***	13 anos	D 01	--	Timor	CSIRO 8238	---	914
	aprox- madamen- te	D 02	--	Timor	CSIRO 8238	---	914
		D 03	--	Timor	CSIRO 8238	---	1219
		D 04	--	Timor	CSIRO 8239	---	1219
		D 05	--	Timor	CSIRO 8239	---	1829

(*) Procedências introduzida pela Araeruz Florestal S. A. e cultivadas em Anhembi, SP.

(**) Procedências introduzidas pela Companhia Floresta Rio Doce S. A. e cultivadas em Anhembi, SP.

(***) Procedências introduzidas em Rio Claro, SP, e plantadas em 1968 com árvores selecionadas pelo IPEF e propagadas vegetativamente através da enxertia em 1974 e cultivadas no campus da E. S. A. "Luiz de Queiroz" - USP, junto à represa de coleta de água.

TABELA 2 - Número de explantes utilizados para os diferentes clones e métodos de esterilização para o estabelecimento da cultura de gemas

Clones	Método		
	Direto	Indireto	Semente
A	--	--	94
B 01	60	32	
B 02	60	00	
B 03	60	62	
B 04	60	65	
B 05	60	09	
C 01	60	98	
C 02	60	27	
C 03	60	30	
C 04	60	08	
C 05	60	45	
D 01	60	08	
D 02	60	00	
D 03	60	46	
D 04	60	169	
D 05	60	08	

1 - Método direto

As etapas do método direto de esterilização dos explantes foram:

- a - coleta de ramos das copas no campo;
- b - transporte dos ramos em sacos plásticos abertos com água na base;
- c - no laboratório, desfolhamento dos ramos;
- d - lavagem dos ramos desfolhados com detergente comercial;
- e - remoção dos segmentos nodais;
- f - lavagem dos segmentos nodais em água corrente por 30 minutos;
- g - tratamento dos segmentos nodais com fungicida comercial em banho com borbulhamento por 30 minutos;
- h - na câmara asséptica, tratamento dos segmentos nodais com hipoclorito de sódio 1% por 30 minutos;
- i - lavagem dos segmentos nodais com água destilada esterilizada por três vezes;
- j - lavagem dos segmentos nodais em ácido clorídrico 0,01 N esterilizado por cinco minutos;
- k - lavagem dos segmentos nodais com água destilada esterilizada por três vezes; e
- l - inoculação.

2 - Método indireto

As etapas da esterilização dos explantes pelo método indireto foram:

- a - coleta dos ramos das copas no campo;
- b - transporte dos ramos em sacos plásticos abertos com âgua na base;
- c - na casa de vegetação, desfolhamento dos ramos;
- d - os ramos desfolhados, tiveram suas bases mergulhadas em recipientes com água e ficaram sob neblina intermiitente;
- e - duas aplicações semanais alternadas de uréia 0,5 g/l e de adubo foliar comercial nos ramos;
- f - duas aplicações semanais alternadas de fungicidas comerciais;
- g - na quarta semana de tratamento dos ramos na casa de vegetação, as gemas foram removidas e transportadas para o laboratório;
- h - lavagem das gemas com detergente comercial;
- i - seguiu-se as etapas a partir do item f do método diureto.

3 - Método semente

As sementes foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos e lavadas com ácido clorídrico 0,01 N esterilizado por 5 minutos e foram inoculadas para geruminar.

c - Avaliação

As avaliações foram feitas aos 10 , 17 , 24 , 31 , 38 e 45 dias de cultura e os parâmetros foram: a) sobrevivência ; b) brotação ; c) contaminação por fungo ; d) contaminação por bactéria e e) oxidação fenólica. Os explantes contaminados tanto por fungos e/ou bactérias foram descartados.

2 - Produção Sucessiva Comparativa de Gemas

a - Procedimentos da cultura de gemas

Após a avaliação dos testes de estabelecimento da cultura de gemas, os explantes nodais que brotaram, foram utilizados para fornecerem gemas para a cultura nº 2. Nessa época, houve queda da temperatura e as gemas pararam de crescer e desenvolver, e chegando a ocorrer morte de gemas, principalmente do grupo de clones D. O início da cultura Nº 2 foi adiada para o início da segunda quinzena de agosto de 1981. A partir de então, as culturas foram mantidas por períodos sucessivos de 45 dias.

Como os clones do grupo D não tiveram condições de continuar em cultura, um clone, E U1 , com a mesma origem somática do clone D 01 e com dez culturas anteriores aos demais foi incluído nos testes experimentais.

O número de explantes por clone e por cultura e os respectivos períodos de cultura constam da Tabela 3.

b - Avaliação

As avaliações da produção sucessiva comparativa de gemas foram feitas aos 45 dias de cultura e o parâmetro utilizado foi a taxa de multiplicação de gemas por clone e grupo de clones por cultura.

3 - Enraizamento Comparativo de Gemas

a - Procedimentos

Para o enraizamento de gemas, os explantes utilizados foram originados das gemas da cultura prévia de gemas.

O enraizamento das gemas dos clones do Grupo A foi feito a partir da cultura nº 2. Os demais clones dos grupos B e C e o clone E U1 foram utilizados para enraizamento de gemas somente a partir da cultura nº 4.

O número de explantes por clone, por cultura e os respectivos períodos de cultura, constam da Tabela 4.

TABELA 3 - Número de explantes por clone por cultura e os respectivos períodos de cultura para a produção de gemas

Cultura nº	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Período de	1982									
Cultura	08/09	09/10	11/12	12/01	02/03	03/04	05/06	06/07	08/09	09/10
Clones										
A 01	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 03	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 07	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 08	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 10	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 21	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 28	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 32	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 35	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 38	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
B 01	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
B 03	10	04	10	10	10	10	10	10	10	10
B 04	10	03	10	10	10	10	10	10	10	10
B 05	10	06	10	10	10	05	10	10	10	10
C 01	26	20	10	10	10	10	10	10	10	10
C 02	41	10	10	10	10	10	10	10	10	10
C 03	09	05	06	03	06	10	10	10	10	10
C 05	13	16	10	10	07	05	05	05	10	10
E U1	40	40	67	68	60	75	56	68	80	80

b - Avaliação

As avaliações do enraizamento de gemas foram feitas aos 45 dias de cultura e o parâmetro utilizado foi a porcentagem de enraizamento por clone e grupos de clones por cultura.

4 - Produção Comparativa de Calo

a - Procedimento

Para a produção de calo, os explantes foram originados de segmentos das gemas da cultura de gemas prévias. Os explantes para a produção de calo tinham cerca de 35,2 mg de peso fresco e cerca de 4,6 mg de peso seco cada um. A produção de calo foi executada somente a partir da cultura nº 6.

O número de explantes por clone por cultura e os respectivos períodos de cultura constam da Tabela 5.

b - Avaliação

As avaliações da produção de calo foram feitas aos 45 dias de cultura e os parâmetros de avaliação foram:

- 1 - peso fresco médio por clone e grupos de clones;
- 2 - peso seco médio por clone e grupos de clones;
- 3 - porcentagem de peso seco médio por clone e grupos de clones; e

TABELA 4 - Número de explantes por clone, por cultura e o período de cultura para a produção de calo

Cultura nº	6	7	8	9	10	11
Período da	1982					
Cultura	02/03	03/04	05/06	06/07	08/09	09/10
Clone						
A 01	02	02	02	02	02	02
A 03	02	02	02	02	02	02
A 07	02	02	02	02	02	02
A 08	02	02	02	02	00	02
A 10	02	02	02	02	02	02
A 21	02	02	02	02	02	02
A 28	02	02	02	02	02	02
A 32	02	02	02	02	02	02
A 35	02	02	02	02	02	02
A 38	02	02	02	02	02	02
B 01	09	05	05	05	05	05
B 03	03	05	05	05	05	05
B 04	00	05	05	05	05	05
B 05	07	05	05	05	05	05
C 01	15	05	05	05	05	05
C 02	00	05	05	05	05	05
C 03	00	05	05	05	05	05
C 05	05	01	05	02	03	05
E U1	20	20	20	20	20	20

TABELA 5 - Número de explantes por clone, por cultura e os respectivos períodos de cultura para o enraizamento de gemas

Cultura nº	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Período de cultura	1981					1982				
	08/09	09/10	11/12	12/01	02/03	03/04	05/06	06/07	08/09	09/10
Clone										
A 01	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 03	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 07	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 08	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 10	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 21	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 28	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 32	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 35	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
A 38	01	04	04	04	04	04	04	04	04	04
B 01	--	--	10	10	10	10	10	06	10	10
B 03	--	--	10	10	10	10	06	10	10	10
B 04	--	--	03	10	10	10	10	10	10	10
B 05	--	--	06	10	10	10	05	06	10	10
C 01	--	--	20	10	10	10	10	10	10	10
C 02	--	--	20	10	10	10	10	10	10	10
C 03	--	--	00	10	06	04	10	05	00	00
C 05	--	--	17	10	10	10	05	00	00	00
E U1	--	--	67	91	99	90	92	88	87	87

- 4 - taxa de crescimento para peso fresco e seco por grupos de clones.

B - MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado foi o de GONÇALVES (1980) com 10 ml em tubo de ensaio 18 x 150 mm e vedados com algodão hidrófilo envolto em gaze.

A composição do meio de cultura para os diferentes testes experimentais foi a seguinte:

- 1 - para o estabelecimento da cultura de gemas a partir de explantes de semente foram usados os sais minerais e agar;
- 2 - para o estabelecimento da cultura de gemas a partir de explantes nodais e de gemas e a produção de gemas, o único regulador de crescimento usado foi 6 BAP 2 mg por litro;
- 3 - para o enraizamento de gemas, o único regulador de crescimento usado foi o ácido indolbutírico 0,1 mg/l;
- 4 - para a produção de calo, os reguladores de crescimento usados foram 6 BAP 0,5 mg/l e ácido indolacético 1,0 mg/l.

C - CONDIÇÕES AMBIENTAIS DE CULTURA

As culturas foram feitas no laboratório com luz complementar de 300 lux, num fotoperíodo de 16/8 horas, fornecida por 50% de lâmpadas Gro-Lux e 50% de lâmpadas fluorescentes luz do dia. Não foi feito controle de temperatura. Os dados de temperatura para Piracicaba, SP, durante o período dos testes experimentais foram fornecidos pelo Departamento de Física e Meteorologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, e constam da Tabela 6.

TABELA 6 - Dados de temperatura para Piracicaba, fornecidos pelo Departamento de Física e Meteorologia da E. S. A. "Luiz de Queiroz", no período de execução dos testes experimentais de março de 1981 a outubro de 1982

Meses	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		Média
	Máxima	Mínima	
Março	31,0 (25,0 - 35,0)	18,3 (13,9 - 21,0)	24,7
Abril	28,8 (23,3 - 31,8)	14,6 (10,3 - 19,0)	22,4
Maio	27,9 (23,1 - 29,9)	12,6 (9,5 - 15,6)	20,3
Junho	23,7 (15,5 - 28,6)	9,4 (2,0 - 20,0)	16,5
Julho	23,5 (13,5 - 29,6)	8,3 (-1,8 - 14,4)	16,0
Agosto	27,5 (17,6 - 30,5)	10,7 (6,5 - 16,1)	19,1
Setembro	30,5 (21,0 - 36,0)	13,5 (7,4 - 19,7)	22,0
Outubro	27,0 (21,0 - 36,0)	15,4 (10,2 - 18,8)	21,1
Novembro	30,2 (24,1 - 32,9)	18,3 (13,6 - 21,2)	24,3
Dezembro	29,0 (19,5 - 33,8)	18,4 (14,1 - 21,1)	23,6
Janeiro	28,8 (23,2 - 32,4)	17,6 (13,7 - 20,2)	23,2
Fevereiro	31,4 (24,6 - 35,0)	19,3 (17,4 - 21,1)	25,4
Março	28,8 (24,2 - 32,2)	18,6 (15,0 - 20,9)	23,7
Abril	26,9 (20,0 - 30,9)	14,0 (10,3 - 17,2)	26,7
Maio	25,4 (18,2 - 29,9)	10,6 (5,5 - 14,9)	18,1
Junho	25,1 (19,0 - 28,9)	13,5 (10,1 - 18,4)	19,3
Julho	25,8 (16,8 - 28,6)	11,2 (5,0 - 19,0)	18,5
Agosto	26,9 (14,9 - 32,0)	12,3 (8,0 - 15,8)	19,5
Setembro	28,5 (22,9 - 32,9)	13,1 (5,2 - 17,2)	20,8
Outubro	28,7 (23,0 - 33,2)	16,0 (9,8 - 19,9)	22,2

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A - TESTES EXPERIMENTAIS

1 - ESTABELECIMENTO DA CULTURA DE GEMAS

a - Método direto

O estabelecimento da cultura de gemas através do método direto, uso de explantes nodais oriundos de ramos de crescimento do ano da copa das árvores, foi possível e os resultados das avaliações constam dos Apêndices 1 , 2 , 3 e 4 e da Figura 2 .

1 - Sobrevivência

A variação da sobrevivência foi observada entre e dentro de grupos de clones. As médias finais das porcenta-

gens da sobrevivência observadas e em ordem decrescente para os clones dentro dos grupos foram: B04 (28,3) , B01 (23,3) , B03 (20,0) , B05 (13,3) , B01 (6,7) ; C05 (50,0) , C04 (46,7), C02 (40,0) , C03 (28,3) , C01 (23,3) ; D05 (15,0), D04 (13,3), D03 (10,0) , D02 (6,7) e D01 (5,0). As médias finais das porcentagens da sobrevivência, por grupo de clones, em ordem decrescente foram: C (37,7) , B (18,3) e D (10,0).

Como podemos observar na Figura 2 , a sobrevivência dos clones (S) decresceu de modo linear durante o período da cultura.

2 - Brotação

A variação da brotação foi observada entre e dentro de grupos de clones. As médias finais das porcentagens da brotação observadas e em ordem decrescente para os clones dentro dos grupos foram: B04 (21,7) , B03 (10,0) , B05 (8,3), B02 (1,7) e B01 (0,0) ; C02 = C05 (25,0) , C01 (21,7) ; C04 (10,0) , C03 (8,3) ; D01 (5,0) , D04 = D05 (1,7) e D02 (0,0). As médias finais das porcentagens da brotação, por grupo de clones, em ordem decrescente foram: C (18,0) , B (8,3) e D (1,7).

Como podemos observar na Figura 2 , as médias gerais da brotação dos clones (B) apresentou uma tendência de estabilização linear durante o período de cultura.

FIGURA 2 - Representação gráfica das porcentagens médias gerais para os parâmetros de avaliação: sobrevivência (S), brotação (B), contaminação por fungo (C_F) e contaminação por bactéria (C_B) durante o período de cultura dos explantes produzidos pelo método direto.

3 - Contaminação por fungo

A variação da contaminação por fungo foi observada entre e dentro de grupos de clones. As médias finais das porcentagens da contaminação por fungo observadas e em ordem decrescente para os clones dentro dos grupos foram: B01 (26,7), B04 (25,0) , B03 (20,0) , B02 (13,3) , B05 (10,0) ; C05 (23,3), C01 (18,3) , C02 (15,0) , C03 e C04 (13,3) ; D02 (75,0) ; D03 (51,7) , D04 (46,7) , D05 (30,0) e D01 (25,0). As médias finais das porcentagens da contaminação por fungo, por grupo de clones, em ordem decrescente foram: D (45,7) , B (19,0) e C (16,6).

Como podemos observar na Figura 2 , as médias gerais da contaminação por fungo dos clones (Cf) apresentou uma tendência para a estabilização após o 24º dia de cultura.

4 - Contaminação por bactéria

A variação da contaminação por bactéria foi observada entre e dentro de grupos de clones. As médias finais das porcentagens da contaminação por bactéria observadas e em ordem decrescente para os clones dentro dos grupos foram: B05 (85,0) , B02 (80,0) , B03 (65,0) , B01 (63,3) , B04 (50,0); C01 (51,7) , C03 (26,7) , C04 = C05 (23,3) , C02 (10,0) ; D01 = D02 = D03 = D04 = D05 (100,0). As médias finais das porcentagens da contaminação por bactéria, por grupo de clones, em ordem decrescente foram: D (100,0) , B (68,7) e C (27,0).

Como podemos observar na Figura 2 , as médias gerais da contaminação por bactéria dos clones (Cb) apresentou uma tendência para a estabilização após o 17º dia de cultura.

5 - Oxidação fenólica

A oxidação fenólica foi total para todos os clones desde o início da cultura.

Todos os clones tiveram sobrevivência no final da cultura, mas nem todos foram capazes de produzir brotação. Quanto a sobrevivência e a brotação, os clones do grupo C apresentaram os melhores resultados, os do grupo B, resultados intermediários e os do grupo D , os piores resultados.

As contaminações tanto por fungo como por bactéria foram de valores maiores no grupo de clones D. As contaminações por fungo foram de valores inferiores e semelhantes para os clones dos grupos B e C. Enquanto, as contaminações por bactéria foram de valores intermediários para os clones do grupo B e de valores inferiores para os clones do grupo C.

b - Método indireto

As avaliações dos resultados da cultura de gemas através do método indireto, uso de explantes de gemas oriundas de ramos cultivados em casa de vegetação, constam dos Apêndices 5 , 6 , 7 e 8 e da Figura 3.

FIGURA 3 - Representação gráfica das porcentagens médias gerais para os parâmetros de avaliação: sobrevivência (S), brotação (B), contaminação por fungo (C_F) e contaminação por bactéria (C_B) durante o período de cultura dos explantes produzidos pelo método indireto.

1 - Sobrevivência

A variação da sobrevivência foi observada entre e dentro de grupos de clones. As médias finais das porcentagens de sobrevivência observadas e em ordem decrescente para os clones dentro dos grupos foram: B01 (37,5) , B05 (22,2) , B04 (13,8) , B03 (4,8) ; C02 (55,6) , C01 (31,6) , C03 (20,0) , C04 (12,5) , C05 (4,4) ; D04 (59,8) , D05 (55,6) , D03 (34,8) , e D01 (12,5). As médias finais das porcentagens da sobrevivência, por grupos de clones, em ordem decrescente foram: D (40,7) , C (24,8) e B (19,6).

Como podemos observar na Figura 3 , as médias gerais da sobrevivência dos clones (S) apresentou uma tendência assintótica.

2 - Brotação

A variação da brotação foi observada entre e dentro de grupos de clones. As médias finais das porcentagens da brotação observadas e em ordem decrescente foram: B01 (37,5) , B05 (22,2) , B04 (13,8) , B03 (4,8) ; C02 (55,6) , C01 (31,6) , C03 (20,0) , C04 (12,5) , C05 (4,4) ; D04 (59,8) , D05 (55,6) , D03 (34,8) e D01 (12,5). As médias finais das porcentagens da brotação, por grupos de clones, em ordem decrescente foram: D (40,7) , C (29,8) e B (19,6).

Como podemos observar na Figura 3 , as médias gerais da brotação para todos os clones (B) apresentou também

aqui uma tendência assintótica. Observe-se que aproximadamente a partir do 24º dia as curvas (S) e (B) se sobrepõem mostrando que todos os explantes sobreviventes desenvolveram brotação.

3 - Contaminação por fungo

A variação da contaminação por fungo foi observada entre e dentro dos grupos de clones. As médias finais das porcentagens da contaminação por fungo observadas e em ordem decrescente foram: B03 (71,0) , B04 (66,1) , B05 (55,6), B01 (18,8) ; C04 (87,5) , C03 (40,0) , C04 (20,0) , C02 (3,7), C01 (2,0) ; D01 (25,0) , D04 (13,2) , D03 (8,7) e D05 (1,1). As médias finais das porcentagens da contaminação por fungo , por grupo de clones, em ordem decrescente foram: B (52,9) , C (30,2) e D (14,5).

Como podemos observar na Figura 3 , as médias gerais da contaminação por fungo dos clones (Cf) apresentou uma tendência para a estabilização após o 17º dia de cultura.

4 - Contaminação por bactéria

A variação da contaminação por bactéria foi observada entre e dentro de grupos de clones. As médias finais das porcentagens da contaminação por bactéria, e em ordem decrescente foram: B03 (27,4) , B01 (21,9) , B04 (13,8) , B05

(0,0) ; C05 (93,3) , C03 (60,0) , C01 (43,9) , C02 (18,5) , C04 (0,0) ; D05 (44,4) , D03 (28,3) , D01 (12,5) e D04 (10,1).

Como podemos observar na Figura 3 , as médias gerais da contaminação por bactéria para os clones (Cb) apresentou uma tendência para a estabilização após o 17º dia de cultura.

5 - Oxidação fenólica

A oxidação fenólica foi total para todos os clones desde o início da cultura.

Nem todos os clones tiveram condições para sobreviver e produzir gemas na casa de vegetação. Os clones B02 e D02 foram eliminados da experimentação.

Como foi observado anteriormente, a partir do 24º dia de cultura, os explantes sobreviventes produziram brotação. Os clones do grupo D apresentaram os melhores resultados para a sobrevivência e a brotação, enquanto os clones do grupo C apresentaram resultados intermediários e os clones do grupo B apresentaram resultados inferiores.

As contaminações finais tanto por fungo como por bactérias foram maiores e semelhantes para os clones dos grupos B e C e menores para os clones do grupo D.

c - Método Sementes

O estabelecimento da cultura de gemas através do método sementes, uso de sementes como explantes, foi possível e os resultados das avaliações constam do Apêndice 9.

A sobrevivência final foi de 80,8% e apresentou uma tendência para decrescer com o período de cultura.

A contaminação por fungo final foi de 3,2% e apresentou uma tendência para aumentar com o período de cultura. Enquanto a contaminação por bactéria foi de 1,1% no início da cultura e se manteve estável até o término do período de cultura.

A oxidação fenólica final foi de 1,1% e com tendência para aumentar com o período de cultura.

d - Comparação dos métodos

Os três métodos usados apresentaram viabilidade para o estabelecimento da cultura de gemas. O método mais viável para o estabelecimento da cultura de gemas foi o de sementes, que apresentou a maior porcentagem de sobrevivência (80,8%) e as menores porcentagens de contaminação tanto por fungo como por bactéria e de oxidação fenólica. Contudo, este método não permite ser aplicado para a clonagem de árvores superiores a não ser que estas sejam de espécies que apresentem tanto a apomixia como a poliembrionia de clivagem do proembrião.

Nestes testes experimentais os métodos mais indicados para a clonagem de árvores superiores são o método direto (uso de explantes nodais) e o método indireto (uso de explantes de gemas) que objetivam a estabilidade genotípica.

Os clones apresentaram comportamentos diferentes nos dois métodos usados. A sobrevivência final média foi superior no método indireto, apesar da existência da redução na sobrevivência final média do grupo de clones C. O mesmo comportamento dos clones foi observado para a brotação nos dois métodos.

A contaminação conjunta final média por fungo e por bactéria foi inferior no método indireto (60,5%) e superior no método direto (92,3%). As principais vantagens do método indireto sobre o método direto são: a redução na contaminação principalmente por bactéria ; a maior sobrevivência; a maior brotação e a maior relação entre sobrevivência e brotação. Contudo, nem todos os ramos têm condições de sobreviverem e de desenvolver brotação na casa de vegetação.

Devem existir efeitos da variação estacional, do crescimento e desenvolvimento das árvores, e genéticas na sobrevivência, brotação, contaminação e oxidação fenólica no estabelecimento da cultura de gemas, como os efeitos encontrados por BACHELARD (1969) no desenvolvimento de gemas epicormicas de *Eucalyptus poliothemos* em explantes nodais.

2 - Produção sucessiva comparativa de gemas

A produção sucessiva comparativa de gemas de clones de diferentes origens genéticas e idades foi viável e os resultados das avaliações das taxas de multiplicação de gemas por clone e grupo de clones por cultura e os respectivos períodos de cultura constam do Apêndice 10 e da Figura 4.

a - Comparação da produção sucessiva de gemas dentro do grupo de clones A

A variação da taxa de multiplicação de gemas do grupo de clones A existiu entre clones (2,0 - 28,0) e entre culturas (2,0 - 17,9). A variação da taxa de multiplicação média para os diferentes clones, em ordem decrescente foi: A07 (16,0) , A01 (14,7) , A35 (14,6) , A38 (13,6) , A10 (12,3), A28 (11,7) , A32 (10,8) , A21 (10,1) , A03 (8,9) e A08 (4,1). Houve uma sistematização da taxa de multiplicação para os clones do grupo A nas culturas nº 2 e 3 .

A variação da taxa de multiplicação de gemas médias dos clones A entre culturas sucessivas foi: 2 (2,0) , 3 (8,0) , 4 (15,0) , 5 (12,1) , 6 (13,9) , 7 (8,8) , 8 (11,8), 9 (13,4) , 10 (14,7) e 11 (17,9). A variação da taxa de multiplicação de gemas nas culturas sucessivas foi principalmente devido à variação da temperatura média como pode ser observado na Figura 4.

FIGURA 4 - Representação gráfica dos resultados das avaliações das produções sucessivas comparativas de gemas através das taxas de multiplicação por grupos de clones (A, B, C e EU1), e médias gerais por cultura (M) e a temperatura média (TM).

b - Comparação da produção sucessiva de gemas dentro do grupo de clones B

A variação da taxa de multiplicação de gemas do grupo de clones B existiu entre clones (2,3 - 19,2) e entre culturas (3,5 - 18,3). A variação da taxa de multiplicação média para os diferentes clones em ordem decrescente foi: B01 (10,6) , B03 (8,7) , B05 (8,4) e B04 (5,8).

A variação da taxa de multiplicação de gemas médias dos clones do grupo B entre culturas sucessivas foi: 2 (3,5) , 3 (5,1) , 4 (8,1) , 5 (8,6) , 6 (7,1) , 7 (3,7) , 8 (5,5) , 9 (11,3) , 10 (14,7) e 11 (18,3). A variação da taxa de multiplicação de gemas nas culturas sucessivas foi principalmente devido à variação da temperatura média como pode ser observado na Figura 4.

c - Comparação da produção sucessiva de gemas dentro do grupo de clones C

A variação da taxa de multiplicação de gemas do grupo de clones C existiu entre clones (1,0 - 20,8) e entre culturas (4,9 - 14,5). A variação da taxa de multiplicação média para os diferentes clones em ordem decrescente foi: C01 (15,2) , C02 (10,3) , C05 (4,3) e C03 (3,9).

A variação da taxa de multiplicação de gemas média dos clones C entre culturas sucessivas foi: 2 (4,9) , 3 (7,9) , 4 (8,6) , 5 (7,6) , 6 (9,2) , 7 (6,5) , 8 (6,1) , 9 (8,8) , 10 (11,5) e 11 (14,5). A variação da taxa de multipli

cação de gemas nas culturas sucessivas foi principalmente devido a variação da temperatura média como pode ser observado na Figura 4.

d - Comparação da produção sucessiva de gemas dentro do clone EU1

A variação da taxa de multiplicação de gemas do clone EU1 entre culturas sucessivas foi: 11 (15,2) , 12 (14,9) , 13 (12,4) , 14 (9,4) , 15 (14,3) , 16 (6,9) , 17 (8,7) , 18 (12,3) , 19 (15,6) e 20 (13,2). Esta variação da taxa de multiplicação de gemas foi principalmente devido à variação da temperatura média, como pode ser observado na Figura 4.

e - Comparação da produção sucessiva de gemas entre grupos de clones e o clone EU1

A variação da taxa de multiplicação de gemas média entre os grupos de clones e o clone EU1 foi: A (11,7) , B (8,4) , C (8,6) e EU1 (11,2). Podemos observar que o grupo de clones A apresentou valores próximos aos do clone EU1 e estes foram superiores aqueles dos grupos de clones B e C que apresentaram valores muito próximos entre si.

A variação da taxa de multiplicação de gemas nas culturas iniciais deve ter sido principalmente efeito do estado fisiológico dos explantes. Estado este que pode ter sido induzido pelo traumatismo do método como da habituação das

condições "in vitro". Clones tanto do grupo B como do grupo C apresentam taxas de multiplicação de gemas muito próximas daquelas dos clones do grupo A e do clone EU1.

Dentro dos grupos de clones, existem alguns que apresentaram taxas de multiplicação de gemas baixas e consistentes durante o período das culturas efetuadas. Por outro lado, existem clones dos grupos B e C que apresentaram taxas de multiplicação de gemas iguais ou superiores às daquelas dos clones do grupo A e do clone EU1.

Na Figura 4 podemos observar que os grupos de clones A e C e o clone EU1 sofreram mais os efeitos da variação da temperatura média.

3 - Enraizamento comparativo de gemas

O enraizamento comparativo de gemas de clones de diferentes origens genéticas e idades, oriundas da produção sucessiva de gemas foi viável e os resultados das avaliações por clones e grupos de clones por cultura e os respectivos períodos de cultura constam do Apêndice 11 e da Figura 5.

a - Enraizamento comparativo de gemas dentro do grupo de clones A

A variação do enraizamento de gemas do grupo de clones A existiu entre clones (0,0 - 100,0%) e entre culturas (70,0 - 100,0%). A variação da porcentagem de enraizamento média para os diferentes clones em ordem decrescente foi:

FIGURA 5 - Representação gráfica dos resultados do enraizamento comparativo de gemas através das porcentagens médias de enraizamento por grupos de clones (A, B, C e EU1) e médias gerais por cultura (M) e a temperatura média (TM).

A28 (96,9) , A01 = A07 = A10 = A32 = A35 (93,8) , A08 (90,6) , A21 (87,5) , A35 (81,3) e A03 (71,9).

A variação da porcentagem média de enraizamento de gemas dos clones do grupo A entre culturas foi: 2 = 3 = 4 = 5 = 6 (100,0) , 7 (90,0) , 8 (70,0) , 9 (75,0) , 10 (95,0), 11 (87,5). A variação da porcentagem de enraizamento nas culturas foi principalmente devido à variação da temperatura média, como pode ser observada na Figura 5.

b - Comparação do enraizamento de gemas dentro do grupo de clones B

A variação da porcentagem de enraizamento de gemas dentro do grupo de clones B , existiu entre clones (40,0 - 100,0) e entre culturas (55,0 - 92,5). A variação da porcentagem média de enraizamento de gemas para os diferentes clones em ordem decrescente foi: B04 (73,8) , B01 = B03 (68,8), e B05 (63,8).

A variação da porcentagem média de enraizamento de gemas dos clones do grupo B entre culturas foi: 4 (92,5), 5 (80,0) , 6 (65,0) , 7 (57,5) , 8 (55,0) , 9 (57,5), 10 (65,0), 11 (77,5). A variação da porcentagem de enraizamento de gemas nas culturas foi principalmente devido à variação da temperatura média, como pode ser observada na Figura 5.

c - Comparação do enraizamento de gemas dentro do grupo de clones C

A variação da porcentagem de enraizamento de gemas dentro do grupo de clones C , existiu entre clones (20,0 - 100,0) e entre culturas (55,0 - 100,0). A variação da porcentagem de enraizamento de gemas média para os diferentes clones em ordem decrescente foi: C01 (92,5) , C05 (64,5) , C02 (62,5) e C03 (42,5).

A variação da porcentagem média de enraizamento de gemas dos clones do grupo C entre culturas foi: 4 (100,0) , 5 (55,0) , 6 (76,7) , 7 (62,5) , 8 (55,0) , 9 (56,7), 10 (65,0) e 11 (85,0). A variação da porcentagem de enraizamento entre as culturas foi principalmente devido à variação da temperatura média, como pode ser observada na Figura 5.

d - Comparação do enraizamento de gemas dentro do clone EU1

A variação da porcentagem de enraizamento de gemas do clone EU1 entre culturas foi: 13 (85,0) , 14 (87,0), 15 (100,0) , 16 (70,0) , 17 (86,0) , 18 (93,0) , 19 (95,0) e 20 (88,0). Esta variação na porcentagem de enraizamento de gemas foi principalmente devido à variação da temperatura média como pode ser observada na Figura 5.

e - Comparação do enraizamento de gemas entre grupos de clones e o clone EU1

A variação da porcentagem de enraizamento de gemas média entre os grupos de clones e o clone EU1 foi: A (89,7) , B (68,8) , C (65,5) e EU1 (88,0). Podemos observar que o grupo de clones A apresentou valores próximos aos do clone EU1 e estes foram superiores àqueles dos grupos de clones B e C que apresentaram valores muito próximos entre si.

A variação da temperatura média afetou o enraizamento de todos os clones, principalmente dos grupos A e C e do clone EU1. O grupo de clones C apresentou uma variabilidade de menor quanto aos efeitos da variação da temperatura média.

Dentro dos grupos de clones, existem clones que apresentaram porcentagens de enraizamento baixas e consistentes durante o período das culturas efetuadas. Por outro lado, existem clones dos grupos B e C que apresentaram porcentagens de enraizamento iguais ou superiores àquelas dos clones do grupo A e do clone EU1.

4 - Produção comparativa de calo

A produção comparativa de calo a partir de explantes de gemas de clones de diferentes origens genéticas e idades foi viável e os resultados das avaliações para peso fresco e peso seco , taxa de crescimento para peso fresco e

peso seco e a porcentagem da produção de peso seco, por clone e grupos de clones por cultura constam dos Apêndices 12 , 13 , 14 e 15 e das Figuras 6 e 7.

a - Comparação da produção de calo dentro do grupo de clones A

1 - Peso fresco

A variação da produção de peso fresco do grupo de clones A existiu entre clones (67,1 - 1.183,1 mg) e entre culturas (376,1 - 707,0 mg). A variação do peso fresco médio (mg) para os clones, em ordem decrescente foi: A32 (761,4), A28 (684,0) , A01 (593,4) , A10 (576,8) , A35 (546,3) , A38 (496,9) , A07 (484,9) , A03 (449,0) , A21 (409,1) e A08 (381,5). A variação do peso fresco médio (mg) dos clones A entre culturas foi: 6 (648,9) , 7 (682,6) , 8 (707,0) , 9 (386,9) , 10 (439,7) e 11 (376,1).

2 - Taxa de crescimento do peso fresco

A variação da taxa de crescimento do peso fresco média por cultura foi: 6 (13,8) , 7 (19,4) , 8 (20,1) , 9 (11,0) , 10 (12,5) e 11 (10,7).

FIGURA 6 - Representação gráfica dos resultados da produção comparativa de calo através das médias por grupos de clones (A, B e C) e do clone EU1 e médias gerais (M) por cultura e a variação da temperatura média (TM).

FIGURA 7 - Representação gráfica dos resultados da produção comparativa de calos através das médias para a porcentagem de peso seco por grupos de clones (A, B e C) e do clone EU1 e as médias gerais (M) por cultura e a variação da temperatura média (TM).

3 - Peso seco

A variação da produção de peso seco do grupo de clones A existiu entre clones (12,2 - 116,5 mg) e entre culturas (49,1 - 91,9 mg). A variação do peso seco médio (mg) para os clones, em ordem decrescente foi: A01 (87,9) , A07 (78,2) , A38 (75,8) , A32 (74,8) , A35 (73,8) , A03 (73,2) , A10 (72,6) , A28 (68,6) , A21 (53,8) e A08 (50,9). A variação do peso médio (mg) dos clones A entre culturas foi: 6 (90,8), 7 (91,9) , 8 (85,8) , 9 (58,3) , 10 (58,2) e 11 (49,1).

4 - Taxa de crescimento do peso seco

A variação da taxa de crescimento do peso seco média por cultura foi: 6 (19,7) , 7 (20,0) , 8 (18,7) , 9 (12,7) , 10 (12,7) e 11 (10,7).

5 - Porcentagem de peso seco

A variação da porcentagem de peso seco existiu entre clones (8,6 - 21,7%) e entre culturas (13,2 - 16,1%). A variação da média da porcentagem de peso seco para os clones, em ordem decrescente foi: A03 (16,6) , A07 (16,1) , A01 = A38 (15,6) , A08 (14,8) , A21 (14,2) , A35 (13,3) , A28 (13,2) , A10 (12,8) e A32 (12,5). A variação da porcentagem de peso seco dos clones entre culturas foi: 6 (14,2) , 7 (14,3) , 8 (14,9) , 9 (16,1) , 10 (14,0) e 11 (13,2).

b - Comparação da produção de calo dentro do grupo de clones B

1 - Peso fresco

A variação da produção de peso fresco do grupo de clones B existiu entre clones (136,4 - 710,7 mg) e entre culturas (310,6 - 516,1 mg). A variação do peso fresco médio (mg) para os clones, em ordem decrescente foi: B01 (573,4), B03 (438,1) , B04 (348,0) e B05 (269,3). A variação do peso fresco médio (mg) dos clones B entre culturas foi: 6 (516,1), 7 (485,3) , 8 (398,0) , 9 (310,6) , 10 (427,4) e 11 (461,8).

2 - Taxa de crescimento do peso fresco

A variação da taxa de crescimento do peso fresco médio por cultura foi: 6 (17,5) , 7 (13,7) , 8 (11,3) , 9 (8,8) , 10 (12,5) e 11 (10,7).

3 - Peso seco

A variação da produção de peso seco do grupo de clones B existiu entre clones (22,2 - 111,6 mg) e entre culturas (53,0 - 89,3 mg). A variação do peso seco médio (mg) para os clones, em ordem decrescente foi: B03 (89,9) , B01 (81,7) , B05 (40,2) e B04 (37,5). A variação do peso seco médio (mg) dos clones B entre culturas foi: 6 (89,3) , 7 (76,0), 8 (72,2) , 9 (53,0) , 10 (58,7) e 11 (63,5).

4 - Taxa de crescimento do peso seco

A variação da taxa de crescimento do peso seco média por cultura foi: 6 (19,4) , 7 (16,5) , 8 (15,7) , 9 (11,5) , 10 (12,8) e 11 (13,8).

5 - Porcentagem de peso seco

A variação da porcentagem de peso seco, existiu entre clones (10,9 - 23,7%) e entre culturas (14,1 - 18,3%). A variação da média da porcentagem de peso seco para os clones, em ordem decrescente foi: B03 (19,1) , B04 = B05 (14,9), e B01 (14,6). A variação da porcentagem de peso seco dos clones entre culturas foi: 6 (17,5) , 7 (15,6) , 8 (18,3) , 9 (16,6) , 10 (14,1) e 11 (14,7).

c - Comparação da produção de calo dentro do grupo de clones C

1 - Peso fresco

A variação da produção de peso fresco do grupo de clones C existiu entre clones (168,4 - 676,7 mg) e entre culturas (283,7 - 618,9 mg). A variação do peso fresco médio (mg) para os clones, em ordem decrescente foi: C02 (531,7) , C01 (500,6) , C05 (357,3) e C03 (315,6). A variação do peso fresco médio entre culturas foi: 6 (618,9) , 7 (532,6) , 8 (370,3) , 9 (375,3) , 10 (283,7) e 11 (458,7).

2 - Taxa de crescimento do peso fresco

A variação da taxa de crescimento média por cultura foi: 6 (17,6) , 7 (15,1) , 8 (10,5) , 9 (10,7) , 10 (8,1) e 11 (13,0).

3 - Peso seco

A variação da produção de peso seco do grupo de clones C existiu entre clones (25,4 - 98,4 mg) e entre culturas (44,7 - 94,9 mg). A variação do peso seco médio (mg) para os clones, em ordem decrescente foi: C02 (82,0) , C01 (77,5) , C05 (60,9) e C03 (44,4). A variação do peso seco médio (mg) dos clones C entre culturas foi: 6 (94,9) , 7 (78,1), 8 (64,8) , 9 (65,2) , 10 (44,7) e 11 (64,5).

4 - Taxa de crescimento do peso seco

A variação da taxa média de crescimento do peso seco por cultura foi: 6 (20,6) , 7 (17,0) , 8 (14,1) , 9 (12,2) , 10 (10,7) e 11 (13,5).

5 - Porcentagem de peso seco

A variação da porcentagem de peso seco existiu entre clones (11,9 - 21,4%) e entre culturas (15,1 - 18,0%). A variação da média da porcentagem de peso seco para os clones, em ordem decrescente, foi: C05 (17,9) , C01 (15,9) ,

C02 (15,4) e C03 (14,8). A variação da porcentagem de peso seco dos clones entre culturas foi: 6 (15,1) , 7 (15,3) , 8 (18,0) , 9 (17,6) , 10 (16,0) e 11 (14,1).

d - Variação dentro da produção de calo do clone EU1

O peso fresco do clone EU1 variou de 316,7 - 891,6 mg entre culturas e o seu peso fresco médio foi: 728,5 mg. A taxa de crescimento de peso fresco por cultura foi: 6 (18,8) , 7 (18,4) , 8 (14,9) , 9 (10,6) , 10 (10,4) e 11 (12,9).

O peso seco do clone EU1 variou de 49,0 - 118,0 mg entre culturas e o seu peso seco médio foi 71,9 mg. A taxa de crescimento de peso seco por cultura foi: 6 (25,7) , 7 (22,5) , 8 (16,6) , 9 (12,2) , 10 (10,7) e 11 (13,5). A variação da porcentagem de peso seco entre culturas foi: 6 (13,6) , 7 (11,6) , 8 (12,3) , 9 (13,3) , 10 (15,5) e 11 (11,9).

e - Comparação da produção de calo entre os grupos de clones e o clone EU1

Houve variações nos diferentes parâmetros utilizados para a avaliação da produção comparativa de calo. A variação da produção de peso fresco médio (mg) e as respecti-

vas taxas de crescimento por grupos de clones e do clone EU1, em ordem decrescente, foram: EU1 (728,5)(17,2) , A (540,2)(14,6) e B (433,2)(12,8) $\approx$ C (439,2)(12,5). A variação da produção de peso seco médio (mg) e as respectivas taxas de crescimento por grupos de clones e do clone EU1 , em ordem decrescente, foram: EU1 (93,0)(16,9) , A (75,8)(15,8) e B (64,0)(15,0) $\approx$ C (60,9)(14,9).

As porcentagens médias do peso seco dos grupos de clones e do clone EU1 , em ordem decrescente, foram: C (16,0) , B (15,9) , A (14,5) e EU1 (13,0).

Na produção de calo, quando se compara o peso fresco, o peso seco e as taxas de crescimento do peso fresco e do seco, o clone EU1 foi o mais produtivo e imediatamente seguido do grupo de clones A. Sendo que os grupos de clones B e C apresentaram valores muito próximos e inferiores àqueles do clone EU1 e do grupo de clones A. Contudo, a situação se inverte quando se compara a porcentagem de peso seco. Os clones dos grupos B e C apresentaram valores muito próximos e superiores àqueles do grupo de clones A e do clone EU1, que também apresentam valores muito próximos.

Estas observações diferem daquelas de STOUT-MYER (1965) que encontrou valores intermediários para a produção de calo de material vegetativo adulto revertido à juvenilidade e superiores para o material juvenil e inferiores para o material adulto.

Existiram diferenças marcantes dentro de grupos de clones, mostrando que a capacidade de produção de calo seria uma característica genética.

f - Comparação da produção de calo entre culturas

A variação da produção de calo entre culturas para os diferentes grupos de clones, mostrou ser uma manifestação do efeito da variação da temperatura média como pode ser observada na Figura 6 para a produção de peso fresco e peso seco e para as taxas de crescimento para peso fresco e peso seco e na Figura 7 para a porcentagem de peso seco.

Na Figura 6, também podemos observar que os grupos de clones A, B e C foram mais sensíveis à variação da temperatura média que o clone EU1.

Na Figura 7, é importante observar que houve um efeito inverso da queda da temperatura na porcentagem de peso seco, esta aumentou com a queda da temperatura.

Os efeitos da temperatura observados na produção de calo, estão em acordo com as observações feitas por STOUTMYER (1965).

5 - Avaliação dos testes experimentais

Os testes experimentais usados neste trabalho objetivaram o estabelecimento da cultura de gemas, a produção de gemas, o enraizamento de gemas e a produção de calo para obter a reversão à juvenilidade de material vegetativo adulto de árvores superiores e a comparação entre grupos de clones de diferentes idades para definir a metodologia da clonagem "in vitro" de árvores.

No estabelecimento da cultura de gemas, o método indireto de preparação de explantes se mostrou mais eficiente reduzindo as contaminações e aumentando a sobrevivência e a brotação em relação ao método direto. Alguns aspectos da esterilização dos explantes ainda podem ser otimizados para diminuir a contaminação e aumentar a sobrevivência e a brotação dos explantes. A grande variação observada entre e dentro de grupos de clones pode ter sido devido principalmente ao estado fisiológico das árvores, ao efeito estacional como aquele observado por BACHELARD (1969) e à componente genética.

Na produção sucessiva comparativa de gemas, os principais objetivos foram a reversão à juvenilidade dos meristemas e a produção de gemas através do efeito traumático da multiplicação sucessiva e do estímulo provocado pela citocinina 6-BAP. Na análise dos resultados, podemos observar que houve um efeito marcante da variação da temperatura o qual pode ser claramente observado na Figura 4, sem que houvesse a-

crêscimos na taxa de multiplicação das culturas sucessivas. Contudo, o estímulo da 6-BAP foi constante durante todo o período das culturas, devendo ser o principal responsável pela reversão à juvenilidade das gemas. Como o estímulo foi uniforme e constante para todos os clones, era de se esperar a ampla variação observada entre estes.

No enraizamento comparativo de gemas, os principais objetivos foram testar a recuperação da capacidade para enraizamento de gemas do material vegetativo adulto e a clonagem deste. Na análise dos resultados, podemos observar um efeito marcante da variação da temperatura média, como pode claramente ser observado na Figura 5, sem que houvesse acrêscimos na porcentagem de enraizamento após culturas sucessivas de gemas. Centenas de gemas enraizadas do clone EU1 foram removidas do tubo de ensaio e transplantadas em recipientes e transportadas para o viveiro. Estas gemas se desenvolveram e comportaram normalmente como mudas produzidas por sementes. Muitas destas desenvolveram "lignotubers". A contagem de estômatos do limbo foliar foi feita, como um método grosseiro para observar a estabilidade genotípica da metodologia usada. Cerca de 345 estômatos por mm^2 foram encontrados em todas as plantas do clone EU1. O método mostrou ser viável para a clonagem de árvores adultas e as taxas de clonagem médias para os diferentes clones foram: A $(11,7 \times 0,897)^n$, B $(8,6 \times 0,168)^n$, C $(8,6 \times 0,645)^n$ e EU1 $(11,2 \times 0,880)^n$, onde n

é o número de culturas. Tanto a taxa de multiplicação como a porcentagem de enraizamento podem ser avaliadas no período de quatro semanas de cultura. Assim sendo, o número de culturas no período de um ano seria 13 , e usando as médias gerais para taxa de multiplicação de gemas (10,0) e para o enraizamento de gemas (75,0%) no período de um ano teríamos $7,5 \times 10^{13}$ gemas de um determinado clone, enraizadas "in vitro".

Na produção de calo, nas diferentes culturas , foram observadas as variações entre e dentro de grupos de clones para a produção de peso fresco e peso seco, taxas de crescimento para o peso fresco e o peso seco e a porcentagem de peso seco, mais o efeito da variação da temperatura média sobre os parâmetros avaliados. Para o grupo de clones A e o clone EU1 , foi observado que estes além de terem as maiores taxas de multiplicação de gemas e as maiores porcentagens de enraizamento também apresentaram os maiores valores para produção de peso fresco, peso seco, taxas de crescimento de peso fresco e de peso seco. Contudo, apresentaram taxas menores que os grupos de clones B e C para a porcentagem de peso seco, os quais apresentaram valores menores para os demais parâmetros avaliados.

Ainda, na produção de calo, nas diferentes culturas, foi observada a diferenciação de gemas a partir de calo. Esta observação revela que as células oriundas das gemas além de terem readquirido a capacidade morfogênética para a

rizogênese também a readquiriram para a diferenciação de gemas. Observação esta, semelhante àquelas do clássico trabalho de SKOOG e MILLER (1957) com medula de plantas de fumo, onde a organogênese foi controlada pelo balanço da concentração de citocinina e de auxina.

B - PROPOSIÇÃO DE UM SISTEMA PARA REGULAÇÃO DA REVERSÃO À JUVENILIDADE E DA DIFERENCIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO CELULAR

1 - Ação dos reguladores de crescimento no metabolismo dos ácidos nucleicos

Nas revisões extensivas da literatura feitas por THIMANN (1972) e SHARP *et alii* (1980), podemos concluir que tanto as auxinas como as citocininas agem de maneira inversa nos sistemas alostéricos da biossíntese dos ácidos nucleicos aos níveis da transcrição e da tradução, e evidenciando a biossíntese de RNA's modificados. Desse modo, as auxinas promoveriam a incorporação de UMP no RNA e aumentariam a relação GMP / AMP agindo como efetadores alostéricos sobre enzimas com duas ligações sulfidrilas. Ao mesmo tempo, as citocininas induziriam a especificidade de tRNA's para aminoácidos com letra inicial U do códon.

2 - Modificações na biossíntese de ácidos nucleicos em sistemas diferenciados

Os resultados dos trabalhos de MILLIKAN e GHOSH (1971) , INGLE (1979) , DOMONEY e TIMMIS (1980) e da revisão da literatura de SHARP *et alii* (1980), podemos observar que e existem diferenças na biossíntese de DNA e de RNA.

No caso do material vegetativo de hera em diferentes estágios do desenvolvimento existiram variações nas quantidades de DNA e RNA, diferenças nas relações GMP / AMP , CMP / UMP e de bases purínicas / pirimidínicas e ainda diferenças na redundância gênica do rRNA.

Em sua revisão SHARP *et alii* (1980) relatam trabalhos com sistemas de células isoladas mostrando que o "pool" de ATP , as taxas de síntese de RNA e de DNA e valores para o "turnover" de RNA foram maiores em células embriogênicas do que em células não embriogênicas.

3 - Regulação da biossíntese de ribonucleotídeos

A regulação da biossíntese de ribonucleotídeos apresenta mecanismos de controle alostéricos em diferentes níveis (Figura 8). Na biossíntese de ribonucleotídeos de purina, seriam em três níveis. O primeiro seria na síntese do precursor 5-fosfo- α -D-ribose-1-pirofosfato (PRPP), onde a enzima ribosefosfato pirofosfoquinase pode ser inibida tanto por ADP como por GDP. O segundo nível seria na reação de transferência do radical de um aminoácido ao PRPP que é catalizada pela

FIGURA 8 - Mecanismos de controle alostéricos na regulação da biossíntese dos ribonucleotídeos. Adaptado de LEHNINGER (1976).

enzima amidofosforibosil transferase, a qual tem inibição tanto por ATP, ADP ou AMP, ou por GTP, GDP ou GMP. O terceiro nível seria na bifurcação do metabolismo do ácido inosínico (IMP) aos ácidos adenilsuccínico e xantílico. No metabolismo do IMP ao ácido adenilsuccínico, a regulação seria através do AMP e do GTP. Enquanto, o metabolismo do IMP ao ácido xantílico é controlado pelo GMP, o do ácido xantílico a GMP é controlado pelo ATP. Este mecanismo de regulação leva a um equilíbrio nas taxas de síntese de AMP e de GMP (LEHNINGER, 1976).

Na síntese dos ribonucleotídeos de pirimidina, seriam dois níveis de regulação. O primeiro nível seria na síntese do PRPP, onde a síntese da enzima ribosefosfato-pirifosfoquinase é controlada pelas bases pirimidínicas. O segundo nível seria na condensação do aspartato com carbamílfosfato, onde a ação da enzima aspartato-transcarbamilase é inibida pelo CTP ou UMP e é ativada pelo ATP (LEHNINGER, 1976).

4 - Regulação da biossíntese de deoxiribonucleotídeos

A biossíntese de deoxiribonucleotídeos é controlada por um mecanismo alostérico de regulação (Figura 9), que envolve a reação entre a tioreduxina reduzida e os NDP's, catalizada pela ribonucleotídeo-difosfato redutase. A redução de CDP a dCDP e de UDP a dUDP por essa enzima é intensamente acelerada pelo ATP, onde a redução de ADP para dADP e de GDP

FIGURA 9 - Mecanismos de controle alostérico na biossíntese de deoxiribonucleosídeos 5'-trifosfatos, ATP, dGTP e dTTP são importantes moduladores e o dATP é o inibidor geral dos estímulos. Adaptado de LEHNINGER (1976).

para dGDP é estimulada por dGTP e dTTP. Contudo, o dATP age como inibidor retroativo para todos os ribonucleosídeos 5'-difosfato. Desde que o PRPP é a primeira fonte de pentose tanto para os ribonucleotídeos como para os deoxiribonucleotídeos, a regulação da ribosefosfato pirofosfoquinase pelos inibidores alostéricos ADP e GDP, esta regulação também é importante para a biossíntese de deoxiribonucleotídeos (LEHNINGER, 1976).

5 - Fluxo de informações genéticas

Algumas noções do fluxo de informações genéticas das sequências de genes do DNA no núcleo para o aparelho sintetizador de proteínas no citoplasma para células eucarióticas estão diagramaticamente representadas na Figura 10.

A molécula de DNA inclui os genes do rRNA no nucléolo e os genes estruturais e reguladores no núcleo. O sistema de transcrição apresenta três compartimentos separados. O primeiro no nucléolo, chamado de RNA polimerase I ou A é o responsável principal pela transcrição do precursor de rRNA que é processado para rRNA's, e estes associados com as proteínas ribossômicas são transportados para o citoplasma onde se tornam ribossomas funcionais. Os outros dois sistemas de transcrição presentes no nucleoplasma são: RNA polimerase II ou B e RNA polimerase III ou C. O sistema RNA polimerase III é o responsável principal pela transcrição de genes para os precursores do tRNA e do RNA 5 S. Estes são transportados pa

FIGURA 10 - Representação diagramática do fluxo de informações genéticas em células eucarióticas. Adaptado de MANS *et alii* (1979).

ra o citoplasma, onde participam da síntese de proteínas. Os produtos da transcrição pelo sistema RNA polimerase II ou B são heterogêneos em tamanho e composição (então referidos como RNA's heterogêneos nucleares - RNA Hn) e podem representar transcrições de genes estruturais para todas as proteínas celulares. As moléculas do RNA Hn passam por todas ou algumas das seguintes reações de processamento: a) poliadenilação, adição de sequências de AMP porção aos seus terminais 3' hidroxila; b) metilação, 2'-O-metilação do penúltimo nucleotídeo no terminal 5' do qual eventualmente se forma uma molécula de mRNA; c) clivagem em fragmentos menores ou mononucleotídeos e d) término ou proteção do terminal 5'. As reações de processamento parecem ser restritas a partes selecionadas das moléculas de RNA Hn, as quais são transportadas para o citoplasma para servirem como mRNA's na montagem de polissomas para a tradução de informação genética em proteínas.

6 - Regulação da reversão à juvenilidade e da diferenciação e desenvolvimento celular

A hereditariedade das células somáticas é uma manifestação dos mecanismos alostéricos na regulação da biossíntese e no deslocamento das relações entre e dentro dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos, e na transcrição, processamento e tradução de informações genéticas na diferenciação e desenvolvimento celular. As citocininas e auxinas agem

inversamente nessa manifestação. Assim sendo, a ação isolada ou conjunta dos reguladores de crescimento provocaria alterações na biossíntese e no deslocamento das relações entre e dentro dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos e no fluxo de informações genéticas conduzindo as células à diferenciação e/ou ao desenvolvimento. Dependendo da origem e do estado fisiológico das células e da quantidade e qualidade do estímulo dos reguladores de crescimento, as células (re) adquirem diferentes capacidades morfogenéticas tanto para a diferenciação como para o desenvolvimento.

IV - CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu chegar às seguintes conclusões:

- A - A clonagem "in vitro" de árvores de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake com diferentes idades e procedências se mostrou viável e com taxa média de clonagem $7,5 \times 10^{13}$ /ano.
- B - O estabelecimento da cultura de gemas de árvores adultas através do método indireto, com explantes oriundos de gemas de ramos cultivados em casa de vegetação, foi mais eficiente que o método direto, com uso de explantes nodais de ramos oriundos do campo, em relação à contaminação tanto por fungo como por bactéria, e à sobrevivência e brotação.

- C - O método semente, com explantes de sementes, foi mais eficiente que os métodos direto e indireto para todos os parâmetros avaliados para o estabelecimento da cultura de gemas.
- D - Houve variação entre e dentro de grupos de clones para o estabelecimento da cultura de gemas, a produção sucessiva e o enraizamento de gemas, e a produção de calo.
- E - A variação da temperatura média afetou mais entre as culturas do que entre grupos de clones, a produção e o enraizamento de gemas, e a produção de calo.
- F - Na produção de calo, a variação da temperatura média afetou direta e proporcionalmente a produção de peso fresco e peso seco e as taxas de crescimento para peso fresco e peso seco, enquanto esta afeta inversa, direta e proporcionalmente a porcentagem de peso seco.
- G - A multiplicação sucessiva e o estímulo constante de 6 BAP (2 mg/l) foram eficientes na reversão à juvenilidade de material vegetativo de árvores adultas.

VI - LITERATURA CITADA

- ANEJA, D. e C. ATAL, 1969. Plantlet formation in tissue culture from lignotubers of *Eucalyptus citriodora* (Hook). Current Science, Bangalore, 38: 69-70.
- BACHELARD, E.P. e B.B. STOWE, 1963. Growth in vitro of roots of *Acer rubrum* and *Eucalyptus camaldulensis*. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 16(1): 20-30.
- BACHELARD, E.P., 1969. The effects of gibberellic acid on internode growth and starch contents of *Eucalyptus camaldulensis* Seedlings. The New Phytologist, Oxford, 68: 1017-22.
- BLAKE, T.J., 1972. Studies on lignotubers of *Eucalyptus obliqua* L'Herit: 3 - the effects of seasonal and nutrition factors on dormant bud development. The New Phytologist, Oxford, 71: 327-34.
- BOCHERT, R., 1975. Gibberellic acid and rejuvenation of apical meristems in *Acacia melanoxylon*, *Naturwissenschaften*, Berlin, 52(3): 65-6.

- BRAUN, A.C., 1969. The cancer problem: a critical analysis and modern synthesis. New York, Columbia University Press. 199p.
- BRIAN, P.W., 1958. Role of gibberellic like hormones in regulation of plant growth and flowering. Nature, London, 181: 1122-8.
- BRINK, R.A., 1962. Phase changes in higher plants and somatic cell heredity. Quarterly Review of Biology, New York, 37: 1-22.
- CAMPINHOS, E. e Y.K. IKEMORI, 1977. Tree improvement of Eucalyptus: preliminary results. In: WORLD CONSULTATION ON FOREST TREE BREEDING, 3, Canberra, 21-26 mar. 1977. Proceedings. Canberra, CSIRO, 1978. v.2, p.717-38.
- CAREY, G., 1930. The leaf buds of some woody perennials in the New South Wales flora. Proceedings Linnean Society, Victoria, 55: 708-37.
- CHALLENGER, S.; H.J. LACEY e B.H. HOWARD, 1964. The demonstration of root promoting substances in apple and plum root stocks. Annual Report East Malling Research Station. p.1248.
- CREMER, K.W., 1972. Morphology and development of the primary and accessory buds of *Eucalyptus regnans*. Australian Journal of Botany, Melbourne, 20: 175-95.
- CRESSWELL, R.J. e R.A. FOSSARD, 1974. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. Australian Forestry, Melbourne, 38: 55-69.

- DOMONEY, C. e J.N. TIMMIS, 1980. Ribosomal RNA gene redundancy in juvenile and mature ivy (*Hedera helix*). Journal of Experimental Botany, London, 31(123): 1193-1110.
- FINE, M., 1968. The control of tracheary element formation in *Eucalyptus* tissue cultures. New Haven, Yale University (Tese - Doutoramento - YU).
- FOSSARD, R.A. 1972. Tissue and organ culture of *Eucalyptus* species. International Association Plant Tissue Culture Newsletter, 6: 10-11.
- FOSSARD, R.A.; C. NITSCH; R.J. CRESSWELL e E.M.C. LEE, 1974. Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. New Zealand Journal Forest Science, Rotorua, 4(2): 267-78.
- FRANCLET, A., 1977. Manipulation des pieds-meres et amelioration de la qualité des boutures. Mangis, AFOCEL.20p.
- FRANCLET, A., 1981. Rajeunissement et propagation végétative des ligneux. Annales de Recherches Sylvicoles, Paris, (1980): 11-39.
- GIROUARD, R.M. e C. HESS, 1966. Distribution and molitivity of rooting cofactors in juvenile and adult growth phases of *Hedera helix*. In: INTERNATIONAL HORTICULTURE CONGRESS, 17 Maryland. Proceedings, p.443-51.
- GIROUARD, R.M., 1967. Anatomical and biochemical studies of rooting stem cuttings of *Hedera helix* L. Lafayette, Purdue University. (Tese-Doutoramento - PU).
- GIROUARD, R.M., 1969. Physiological and biochemical studies of adventitious root formation: extractile rooting cofactors from *Hedera helix*. Canadian Journal of Botany, Pttawa, 47: 687-99.

- GONÇALVES, A.N., 1975. The growth and developmental physiology of *Eucalyptus* in cell and tissue culture systems. Columbus, The Ohio State University, 210 p. (Tese-Mestrado, OSU).
- GONÇALVES, A.N., 1980. Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake in cell and tissue culture systems. In: SIMPOSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENETICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO, Águas de São Pedro, 25-30 Agosto 1980. (no prelo).
- GONÇALVES, A.N.; M.A. MACHADO; L.S. CALDAS; W.R. SHARP e H.A. MELLO, 1977. Tissue culture of *Eucalyptus*. In: SHARP, W.R.; P.O. LARSEN; E.F. PADDOCK e V. RAGHAVAN, Plant Cell and Tissue Culture: principles and applications, Columbus, The Ohio State University Press. p.509-26.
- GUPTA, P.K.; A.F. MASCARENHAS e J. RAGANNNATHAN, 1981. Sissue culture of forest trees - clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook by tissue culture. Plant Science Letters, 20: 195-201
- HESS, C., 1959. A study of plant growth substances in easy and difficult to root cuttings. Plant Propagation Society, Proceedings, 9: 39-45.
- HESS, C., 1961. The physiology of root initiation in easy and difficult to root cuttings. Ambles, AMCHEM, Homol., 3: 3-6.
- HESS, C., 1962a. Physiological analysis of root initiation in easy and difficult to root cuttings. In: INTERNATIONAL HORTICULTURE CONGRESS, 15, Brusseles, Proceedings, p.375 81.

- HESS, C., 1962b. Characterization of rooting cofactors extracted from *Hedera helix* L. and *Hibiscus rosacinensis* L. Plant Propagation Society, Proceedings, 12: 51-7.
- HESS, C., 1964. Natural occurring substances which stimulates root initiation. In: NITSCH, J.P. Regulateurs Naturels de la Croissance Vegetale. Gif Sur Yvette, C.N.R.S. p.517-27.
- HESS, C., 1965. Phenolic compounds as stimulators of root initiation. Plant Physiology, Washington, 40 (Supl.): 45.
- HESS, C., 1966. Root initiation and juvenility - a possible implication of terpene compounds. In: INTERNATIONAL HORTICULTURE CONGRESS, 17; Maryland. Proceedings, p.443-51.
- HODGES, C.S. e M.S. REIS, 1976. A canker disease of Eucalyptus in Brazil caused by Diaporthe cubensis Bruner, Brasília, PRODEPEF. 6p. (Field document, 14).
- INGLE, J., 1979. Plant ribosomal RNA genes: a dynamic system? In: RUBENSTEIN, J.; R.L. PHILLIPS; C.E. GREEN e B.G. GENBENBACH. Molecular Biology of Plants. New York, Academic Press, p.139-64.
- JACOBS, M.R., 1935. The primary and secondary leaf bearing systems of the eucalyptus and thir survival significance. Bulletin Forest Bureau, Canberra, 18: 1-78.
- JACOBS, M.R., 1950. Growth habits of the eucalyptus. Canberra, Commonwealth Government Printer, 262p.
- JACQUIOT, C., 1964. Structure of excised roots or of organs formed de novo from cambial tissue grown in culture. Rev. Cytol. Biol. Veg., 27: 319-22.

- KITAHARA, E.H. e L.S. CALDAS, 1975. Shoot and root formation in hypocotyl callus cultures of *Eucalyptus*. Forest Science, Washington, 22: 242-3.
- KLEINSCHMIT, J., 1977. Problems of vegetative reproduction. In: WORLD CONSULTATION ON FOREST TREE BREEDING, 3, Canberra, 21-26 mar. 1977. Proceedings, Canberra, CSIRO, 1978. v.2, p.783-98.
- KOZLOWSKI, T.T., 1971. Growth and development of trees, New York, Academic Press. v.1.
- LANGNER, W., 1964. The origins of juvenile forms of *Chamaecyparis*. Silvae Genetica, Frankfurt, 12(3): 57-63.
- LEE, E.C.M. e R.A. FOSSARD, 1974. The effects of various auxins and cytokinins on the in vitro culture of stem and lignotuber tissues of *Eucalyptus bancroftii*, Maiden. The New Phytologist, Oxford, 73: 707-17.
- LEHNINGER, A.L., 1976. Biochemistry. 2^{ed} New York, Worth Publishers. 1104p.
- LIBBY, W.J. e I.V. HOOD, 1976. Juvenility in hedged radiata pine. Acta Horticultural, 56: 91-8.
- MANS, R.J.; C.O. GARDNER JR.; T.J. WALTER, 1979. Selective transcription and processing in the regulation of plant growth. In: RUBENSTEIN, I.; P.L. PHILLIPS, E.E. GREEN e G. GENGENBACH, Molecular Biology of Plants. New York, Academic Press, p.165-95.
- MARCAVILLACA, M.E. e E.R. MONTALDI, 1964. Cultivo in vitro de tejidos de eucalipto. Idia. Suplemento, Buenos Aires, 12: 62-4.

- MILLIKAN, D.F. e B.N. GHOSH, 1971. Changes in nucleic acids with maturation and senescence in *Hedera helix*. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 24: 10-3.
- MUZIK, T.J. e H.J. CRUZADO, 1958. Transmission of juvenile rooting ability from seedlings to adults of *Hevea brasiliensis*. Nature, London, 181: 1288.
- PATON, D.M.; R.R. WILLING; W. NICHOLS e L.D. PRYOR, 1970. Rooting of stem cutting of *Eucalyptus*: a rooting inhibitor in adult tissue. Australian Journal of Botany, Melbourne, 18: 175-85.
- PENFOLD, A.R. e J.L. WILLIS, 1961. The Eucalyptus: botany, cultivation, chemistry and utilization. London, Leonard Hill. 551p.
- PITON, F., 1969. Quelques observations citologiques sur des tissus d'*Eucalyptus camaldulensis* cultivés in vitro. Rev. Gen. Bot., 76: 287-307.
- PRYOR, L.D., 1976. The Biology of Eucalyptus. London, Edward Arnold, 182p.
- ROBBINS, W.J. e A. HERVEY, 1970. Tissue culture of callus from seedling and adult stages of *Hedera helix*. American Journal of Botany, New York, 57(4): 542-57.
- ROBBINS, W.J., 1957a. Physiological aspects of aging in plant. American Journal of Botany, New York, 44: 289-94.
- ROBBINS, W.J., 1957b. Gibberellic acid and the reversal of adult *Hedera helix* to a juvenile state. American Journal of Botany, New York, 44: 743-6.

- ROBBINS, W.J., 1959. Juvenility in trees and Shrubs. In: INTERNATIONAL BOTANY CONGRESS, Monaco. Proceedings, v.2, p.328-9.
- ROBBINS, W.J., 1960. Further observations on juvenile and adult *Hedera helix*. American Journal of Botany, New York, 47: 485-91.
- SCURFIELD, G. e C.W.E. MOORE, 1958. Effects of gibberellic acid induced proliferation in debudded tobacco plants. Plant Physiology, Washington, 43: 284-8.
- SHARP, W.R.; M.R. SONDAHL; L.S. CALDAS e S.B. MARAFFA, 1980. The physiology of in vitro asexual embriogenesis. In: JANICK, J., Horticulture Reviews. Westport, AVI Publishing. v.2, p.268-310.
- SKOOG, F. e C.O. MILLER, 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Society of Experimental Biology, Symposium, 11:
- STOUTMYER, V.T. e O.K. BRITT, 1963. Tissue cultures of juvenile and adult specimens of ivy. Nature, London, 199: 397-8.
- STOUTMYER, V.T. e O.K. BRITT, 1965. The behavior of tissue cultures from English and Algerian ivy in different growth phases. American Journal of Botany, New York, 52(8): 805-10.
- STOUTMYER, V.T. e O.K. BRITT, 1969. Growth and habituation in tissue cultures of English ivy, *Hedera helix*. American Journal of Botany, New York, 56(2): 222-6.

- SUSSEX, I., 1965. The origin and morphogenesis of *Eucalyptus* cell population. In: WHITE, P.R. International Conference on Plant Tissue Culture. Berkeley, McCutchen, p.383-91.
- THIMANN, K., 1972. The natural plant hormones. In: STEWARD, F.C., Plant Physiology; a treatise. New York, Academic Press. v.VI B.
- TOMAZELLO FILHO, M., 1976. Estudos sobre o cancro causado por *Diaporthe cubensis* Bruner: etiologia e resistência em *Eucalyptus* spp. Piracicaba, ESALQ/USP. 106p. (Tese - Mestrado - ESALQ).
- TRIPPI, V.S., 1963. Studies on ontogeny and senility in plants. 1-6. Phyton., Buenos Aires, 20(2): 137-74.
- TURNBULL, J. e I. BROOKER, 1978. Timor mountain gum - *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. Forest Tree Series, CSIRO, Melbourne, 214: 1-3.
- VIEIRA, F.S., 1980. Procedências de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. In: SIMPÓSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO, Águas de São Pedro, 25-30 agosto 1980. (no prelo).
- WINTON, L., 1972. Bibliography of somatic callus cultures from deciduous trees. Appleton. Genetics and Physiology Notes, Appleton, 18: 1-19.

VII - A P Ê N D I C E

APÊNDICE 1 - Resultados da avaliação do estabelecimento da cultura de gemas dos clones do grupo B, esterilizados pelo método direto

Avaliação	Dias	10	17	24	31	38	45
Sobrevivência (%)	B 01	80,0	53,3	41,7	31,7	23,3	23,3
	B 02	95,0	83,3	26,7	20,0	06,7	06,7
	B 03	98,3	43,3	31,7	31,7	20,0	20,0
	B 04	76,7	60,0	50,0	41,7	36,7	28,3
	B 05	93,3	60,0	46,7	41,7	33,3	13,3
	Média	88,7	60,0	39,4	33,4	24,0	18,3
Brotação (%)	B 01	00,0	01,7	01,7	00,0	00,0	00,0
	B 02	13,3	13,3	06,7	10,0	03,3	01,7
	B 03	13,3	11,7	10,0	10,0	10,0	10,0
	B 04	06,7	11,7	11,7	13,3	16,7	21,7
	B 05	06,7	20,0	20,0	08,3	13,3	08,3
	Média	08,0	11,7	10,0	08,3	08,7	08,3
Contaminação Fungo (%)	B 01	18,3	23,3	26,7	26,7	26,7	26,7
	B 02	03,3	06,7	10,0	13,3	13,3	13,3
	B 03	11,7	13,3	18,3	20,0	20,0	20,0
	B 04	11,7	20,0	21,7	23,3	23,3	25,0
	B 05	03,3	06,7	10,0	10,0	10,0	10,0
	Média	09,7	14,0	17,4	18,7	18,7	19,0
Contaminação Bactéria (%)	B 01	51,7	61,7	63,3	63,3	63,3	63,3
	B 02	75,0	78,3	78,3	80,0	80,0	80,0
	B 03	58,3	63,3	63,3	65,0	65,0	65,0
	B 04	40,0	48,3	48,3	48,3	48,3	50,0
	B 05	70,0	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0
	Média	59,0	67,3	67,6	68,3	68,3	68,7
Oxidação Fenólica (%)	B 01	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	B 02	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	B 03	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	B 04	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	B 05	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Média	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

APÊNDICE 2 - Resultados da avaliação do estabelecimento da cultura de gemas dos clones do grupo C, esterilizados pelo método direto

Avaliação	Dias	10	17	24	31	38	45
Sobrevivência (%)	C 01	96,7	81,7	75,0	66,7	55,0	23,3
	C 02	80,0	65,0	61,7	55,0	50,0	40,0
	C 03	93,3	93,3	88,3	76,7	36,7	28,3
	C 04	96,7	85,0	83,3	66,7	56,7	46,7
	C 05	90,0	71,7	66,7	58,3	55,0	50,0
	Média	91,3	79,3	75,0	64,7	50,7	37,7
Brotação (%)	C 01	06,7	08,3	15,0	18,3	23,3	21,7
	C 02	21,7	25,0	21,7	18,3	15,0	25,0
	C 03	13,3	11,7	13,3	03,3	01,7	08,3
	C 04	10,0	16,7	11,7	16,7	11,7	10,0
	C 05	10,0	16,7	11,7	16,7	11,7	10,0
	Média	17,4	19,0	18,7	17,3	17,7	18,0
Contaminação Fungo (%)	C 01	10,0	11,7	16,7	16,7	18,3	18,3
	C 02	13,3	13,3	15,0	15,0	15,0	15,0
	C 03	06,7	11,7	11,7	13,3	13,3	13,3
	C 04	10,0	10,0	10,0	13,3	13,3	13,3
	C 05	11,7	16,7	21,7	23,3	23,3	23,3
	Média	10,3	12,7	15,0	16,3	16,6	16,6
Contaminação Bactéria (%)	C 01	23,3	30,0	38,3	43,3	50,0	51,7
	C 02	05,0	05,0	08,3	08,3	10,0	10,0
	C 03	06,7	21,7	21,7	23,3	23,3	26,7
	C 04	15,0	23,3	23,3	23,3	23,3	23,3
	C 05	15,0	20,0	20,0	20,0	23,3	23,3
	Média	13,1	20,0	22,3	23,6	26,0	27,0
Oxidação Fenólica (%)	C 01	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	C 02	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	C 03	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	C 04	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	C 05	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Média	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

APÊNDICE 3 - Resultados da avaliação do estabelecimento da cultura de gema dos clones do grupo D, esterilizados pelo método direto

Avaliação	Dias	10	17	24	31	38	45
Sobrevivência (%)	D 01	83,3	83,3	71,7	58,3	33,3	05,0
	D 02	80,0	76,7	41,7	41,7	33,3	06,7
	D 03	46,7	35,0	16,7	11,7	10,0	10,0
	D 04	90,0	70,0	51,7	41,7	31,7	13,3
	D 05	70,0	41,7	30,0	30,0	26,7	15,0
	Média	74,0	61,3	42,4	36,7	27,0	10,0
Brotação (%)	D 01	00,0	05,0	05,0	05,0	05,0	05,0
	D 02	00,0	00,0	00,0	00,0	00,0	00,0
	D 03	00,0	03,3	05,0	00,0	00,0	00,0
	D 04	00,0	01,7	01,7	01,7	01,7	01,7
	D 05	00,0	03,3	01,7	01,7	01,7	01,7
	Média	00,0	02,7	02,7	01,7	01,7	01,7
Contaminação Fungo (%)	D 01	06,7	16,7	20,0	25,0	25,0	25,0
	D 02	20,0	51,7	51,7	51,7	71,7	75,0
	D 03	23,3	41,7	41,7	45,0	51,7	51,7
	D 04	16,7	30,0	41,7	41,7	46,7	46,7
	D 05	18,3	21,7	21,7	25,0	26,7	30,0
	Média	17,0	32,4	35,4	37,7	44,4	45,7
Contaminação Bactéria (%)	D 01	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	D 02	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	D 03	83,3	93,3	100,0	100,0	100,0	100,0
	D 04	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	D 05	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Média	96,7	98,7	100,0	100,0	100,0	100,0
Oxidação Fenólica (%)	D 01	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	D 02	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	D 03	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	D 04	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	D 05	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Média	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

APÊNDICE 4 - Resultados da avaliação do estabelecimento da cultura de gemas dos grupos de clones B , C e D, esterilizados pelo método direto

Avaliação	Dias	10	17	24	31	38	45
Sobrevivência (%)	B	88,7	60,0	39,4	33,4	24,0	18,3
	C	91,3	79,3	75,0	64,7	50,7	37,7
	D	74,0	61,3	42,4	36,7	27,0	10,0
	Média	84,7	66,9	50,6	44,9	33,9	22,0
Brotação (%)	B	08,0	11,7	10,0	08,3	08,7	08,3
	C	17,4	19,0	18,7	17,3	17,7	18,0
	D	00,0	02,7	02,7	01,7	01,7	01,7
	Média	08,5	11,1	10,5	09,1	09,4	09,3
Contaminação Fungo (%)	B	09,7	14,0	17,4	18,7	18,7	19,0
	C	10,3	12,7	15,0	16,3	16,6	16,6
	D	17,0	32,4	35,4	37,7	44,4	45,7
	Média	12,3	19,7	22,6	24,2	26,6	27,1
Contaminação Bactéria (%)	B	59,0	67,3	67,6	68,3	68,3	68,7
	C	13,1	20,0	22,3	23,6	26,0	27,0
	D	96,7	98,7	100,0	100,0	100,0	100,0
	Média	56,3	62,0	63,3	64,0	64,8	65,2
Oxidação Fenólica (%)	B	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	C	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	D	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Média	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

APÊNDICE 5 - Resultados da avaliação do estabelecimento da cultura de gemas dos clones do grupo B, esterilizados pelo método indireto

Avaliação	Dias	10	17	24	31	38	45
Sobrevivência (%)	B 01	56,3	43,8	37,5	37,5	37,5	37,5
	B 03	40,3	09,7	06,5	04,8	04,8	04,8
	B 04	53,8	43,1	15,4	15,4	13,8	13,8
	B 05	100,0	33,3	33,3	33,3	22,2	22,2
	Média	62,5	32,5	23,2	22,8	19,6	19,6
Brotação (%)	B 01	56,3	43,8	40,6	37,5	37,5	37,5
	B 02	40,3	09,7	06,5	04,8	04,8	04,8
	B 04	46,2	43,1	15,4	15,4	13,8	13,8
	B 05	100,0	33,3	33,3	33,3	22,2	22,2
	Média	60,7	32,5	24,0	22,8	19,6	19,6
Contaminação Fungo (%)	B 01	15,6	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8
	B 02	59,7	71,0	71,0	71,0	71,0	71,0
	B 04	46,2	66,1	66,1	66,1	66,1	66,1
	B 05	33,3	55,6	55,6	55,6	55,6	55,6
	Média	38,7	52,9	52,9	52,9	52,9	52,9
Contaminação Bactéria (%)	B 01	03,1	15,6	18,8	21,9	21,9	21,9
	B 03	03,2	22,6	25,8	27,4	27,4	27,4
	B 04	12,3	13,8	13,8	13,8	13,8	13,8
	B 05	00,0	00,0	00,0	00,0	00,0	00,0
	Média	04,7	13,0	14,6	15,8	15,8	15,8
Oxidação Fenólica (%)	B 01	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	B 03	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	B 04	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	B 05	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Média	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

APÊNDICE 6 - Resultados da avaliação do estabelecimento da cultura de gemas dos clones do grupo C, esterizados pelo método indireto

Avaliação	Dias	10	17	24	31	38	45
Sobrevivência (%)	C 01	85,7	36,7	36,7	34,7	33,7	31,6
	C 02	96,3	92,6	63,0	59,3	59,3	55,6
	C 03	83,3	46,7	36,7	26,7	20,0	20,0
	C 04	25,0	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
	C 05	57,8	11,1	04,4	04,4	04,4	04,4
	Média	69,6	39,9	30,7	27,5	26,0	24,8
Brotação (%)	C 01	68,4	36,7	36,7	34,7	33,7	31,6
	C 02	66,7	66,7	63,0	59,3	59,3	55,6
	C 03	83,3	46,7	36,7	26,7	20,0	20,0
	C 04	25,0	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
	C 05	57,8	11,1	04,4	04,4	04,4	04,4
	Média	60,2	34,7	30,7	27,5	26,0	24,8
Contaminação Fungo (%)	C 01	00,0	00,0	00,0	00,0	01,0	02,0
	C 02	00,0	00,0	03,7	03,7	03,7	03,7
	C 03	16,7	36,7	36,7	40,0	40,0	40,0
	C 04	75,0	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5
	C 05	11,1	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
	Média	20,6	28,8	29,6	30,2	30,2	30,2
Contaminação Bactéria (%)	C 01	07,1	17,3	37,8	39,8	41,8	43,9
	C 02	07,4	11,1	14,8	18,5	18,5	18,5
	C 03	00,0	36,7	46,7	53,3	60,0	60,0
	C 04	00,0	00,0	00,0	00,0	00,0	00,0
	C 05	77,8	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3
	Média	18,5	31,7	38,5	41,0	42,7	43,1
Oxidação Fenólica (%)	C 01	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	C 02	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	C 03	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	C 04	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	C 05	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Média	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

APÊNDICE 7 - Resultados da avaliação do estabelecimento da cultura de gemas dos clones do grupo D, esterilizados pelo método indireto

Avaliação	Dias	10	17	24	31	38	45
Sobrevivência (%)	D 01	75,0	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
	D 03	95,7	76,1	41,3	39,1	37,0	34,8
	D 04	78,7	73,0	64,5	60,4	60,4	59,8
	D 05	66,7	66,7	55,6	55,6	55,6	55,6
	Média	79,0	57,1	43,5	41,9	41,4	40,7
Brotação (%)	D 01	75,0	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
	D 03	59,2	56,5	41,3	39,1	37,0	34,8
	D 04	78,7	67,5	64,5	60,4	60,4	59,8
	D 05	66,7	66,7	55,6	55,6	55,6	55,6
	Média	69,9	50,8	43,5	41,9	41,4	40,7
Contaminação Fungo (%)	D 01	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
	D 03	02,2	04,3	06,5	08,7	08,7	08,7
	D 04	10,1	11,8	13,2	13,2	13,2	13,2
	D 05	01,1	01,1	01,1	01,1	01,1	01,1
	Média	09,6	10,6	14,0	14,5	14,5	14,5
Contaminação Bactéria (%)	D 01	00,0	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
	D 03	02,2	15,2	23,9	28,3	28,3	28,3
	D 04	01,8	04,1	05,3	09,5	10,1	10,1
	D 05	33,3	44,4	44,4	44,4	44,4	44,4
	Média	09,3	19,0	21,5	23,7	23,8	23,8
Oxidação Fenólica (%)	D 01	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	D 03	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	D 04	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	D 05	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Média	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

APÊNDICE 8 - Resultados da avaliação do estabelecimento da cultura de gemas dos grupos de clones B , C e D, esterilizados pelo método indireto

Avaliação	Dias	10	17	24	31	36	45
Sobrevivência (%)	B	62,5	32,5	23,2	22,8	19,6	19,6
	C	69,6	39,9	30,7	27,5	26,0	24,8
	D	79,0	57,1	43,5	41,9	41,4	40,7
	Média	70,4	43,2	32,5	30,7	29,0	28,4
Brotação (%)	B	60,7	32,5	24,0	25,8	19,6	19,6
	C	60,2	34,7	30,7	27,5	26,0	24,8
	D	69,9	50,8	43,5	41,9	41,4	40,7
	Média	63,6	39,3	32,5	30,7	29,0	28,4
Contaminação Fungo (%)	B	38,7	52,9	52,9	52,9	52,9	52,9
	C	20,6	28,8	29,6	30,2	30,2	30,2
	D	09,6	10,6	14,0	14,5	14,5	14,5
	Média	23,0	30,8	32,2	32,5	32,5	32,5
Contaminação Bactéria (%)	B	04,7	13,0	14,6	15,8	15,8	15,8
	C	18,5	31,7	38,5	41,0	42,7	43,1
	D	09,3	19,0	21,5	23,7	23,8	23,8
	Média	10,8	21,2	24,9	26,8	26,8	27,6
Oxidação Fenólica (%)	B	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	C	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	D	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Média	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

APÊNDICE 9 - Resultados da avaliação do estabelecimento da cultura de gemas pelo método do uso de explantes de sementes

Avaliação	Dias	10	17	24	31	38	45
Sobrevivência (%)		100,0	100,0	97,9	92,6	85,1	80,8
Brotação (%)		--	--	--	--	--	--
Contaminação Fungo (%)		01,1	01,1	01,1	02,1	02,1	03,2
Contaminação Bactéria (%)		01,1	01,1	01,1	01,1	01,1	01,1
Oxidação Fenólica (%)		00,0	00,0	00,0	01,1	01,1	01,1

APÊNDICE 10 - Resultados da avaliação da produção sucessiva comparativa de gemas através da taxa de multiplicação de gemas por clone e grupo de clones por cultura e os respectivos períodos de cultura.

Cultura Nº	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Média
Período de											
1981											
1982											
cultura	08/09	09/10	11/12	12/01	02/03	03/04	05/06	06/07	08/09	09/10	
Clone											
A 01	2,0	8,0	27,0	12,5	17,0	14,0	15,5	13,8	17,8	21,0	14,9
A 03	2,0	8,0	14,0	13,5	9,5	6,5	7,0	9,5	7,5	11,3	8,9
A 07	2,0	8,0	16,0	24,0	23,0	16,0	18,5	13,0	15,3	24,3	16,0
A 08	2,0	8,0	2,0	2,8	4,4	3,4	3,0	4,0	5,5	5,7	4,1
A 10	2,0	8,0	16,0	8,0	15,5	9,5	14,5	12,0	17,5	19,4	12,3
A 21	2,0	8,0	15,0	11,0	12,0	5,5	3,3	10,4	13,0	20,5	10,1
A 28	2,0	8,0	28,0	18,5	11,0	9,5	11,8	14,3	12,0	17,0	11,7
A 32	2,0	8,0	13,0	8,5	4,4	9,0	14,3	17,0	16,0	16,0	10,8
A 35	2,0	8,0	8,0	13,0	21,5	17,5	14,5	19,0	21,3	21,0	14,5
A 38	2,0	8,0	11,0	9,0	20,5	7,0	16,0	21,0	19,3	22,5	13,6
Média	2,0	8,0	15,0	12,1	13,9	8,8	11,8	13,4	14,7	17,9	11,7
B 01	4,0	13,0	11,5	14,7	9,3	4,5	3,6	10,9	16,8	18,0	10,6
B 03	5,0	1,6	5,5	7,0	7,8	3,2	8,7	13,2	16,0	19,2	8,7
B 04	2,3	2,4	5,2	4,2	5,6	4,7	4,8	8,0	8,4	11,7	5,8
B 05	2,7	2,9	10,3	8,4	5,6	2,2	5,0	13,0	17,6	18,3	8,6
Média	3,5	5,1	8,1	8,6	7,1	3,7	5,5	11,3	14,7	16,8	8,4
C 01	6,0	13,1	12,8	16,4	20,5	12,5	11,9	17,5	20,8	20,5	15,2
C 02	5,0	13,7	11,0	7,0	6,0	6,2	7,2	10,0	17,0	20,2	10,3
C 03	3,5	1,0	2,4	2,0	7,5	4,4	4,0	3,3	3,8	9,4	3,9
C 05	5,0	3,9	5,2	5,4	2,8	2,7	1,4	4,5	4,4	8,0	41,3
Média	4,9	7,9	8,6	7,6	9,2	6,5	6,1	8,8	11,5	14,5	8,6
E U1	15,2	14,9	12,4	9,4	14,3	6,9	8,7	12,3	15,6	13,2	11,2
Média Geral	6,4	9,0	11,0	9,4	11,1	6,7	8,0	11,5	14,1	15,6	10,0

APÊNDICE 11 - Resultados da avaliação do enraizamento comparativo de gemas por clone e grupos de clones por cultura e os respectivos períodos de cultura.

Cultura nº	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Média
Período de											
cultura	1981			1982							Média
	08/09	09/10	11/12	12/01	02/03	03/04	05/06	06/07	08/09	09/11	
Clone											
A 01	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	75,0	93,8
A 03	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	75,0	100,0	75,0	75,0	50,0	71,9
A 07	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	75,0	100,0	100,0	75,0	93,8
A 08	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	75,0	100,0	50,0	100,0	100,0	90,6
A 10	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	75,0	75,0	100,0	100,0	93,8
A 21	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	75,0	75,0	100,0	100,0	100,0	87,5
A 28	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	75,0	100,0	100,0	96,9
A 32	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	75,0	75,0	100,0	100,0	100,0	93,8
A 35	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	75,0	75,0	100,0	93,8
A 38	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	25,0	50,0	100,0	75,0	81,3
Média	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	90,0	70,0	75,0	95,0	87,5	89,7
Grupo											
B 01	--	--	90,0	90,0	60,0	40,0	70,0	50,0	70,0	80,0	68,8
B 03	--	--	80,0	70,0	70,0	60,0	50,0	60,0	60,0	100,0	68,8
B 04	--	--	100,0	80,0	70,0	90,0	60,0	50,0	60,0	80,0	73,8
B 05	--	--	100,0	80,0	60,0	40,0	40,0	70,0	70,0	50,0	63,8
Média	--	--	92,5	80,0	65,0	57,5	55,0	57,5	65,0	77,5	68,8
Cultura											
C 01	--	--	100,0	70,0	100,0	100,0	100,0	90,0	90,0	90,0	92,5
C 02	--	--	100,0	50,0	70,0	60,0	60,0	40,0	40,0	80,0	92,5
C 03	--	--	--	40,0	--	50,0	40,0	40,0	--	--	42,5
C 05	--	--	100,0	60,0	60,0	40,0	20,0	--	--	--	64,5
Média	--	--	100,0	55,0	76,7	62,5	55,0	56,7	65,0	85,0	65,5
Grupo Geral											
E 01	--	--	85,0	87,0	100,0	70,0	86,0	93,0	95,0	88,0	88,0
Média Geral	--	--	94,3	80,5	85,4	70,0	66,5	70,6	80,0	84,5	

APÊNDICE 12 - Resultados da avaliação da produção comparativa de calo em peso fresco médio (mg) por clone e grupos de clones por cultura

Clone	Cultura nº						Média
	6	7	8	9	10	11	
A 01	812,0	775,1	923,0	407,0	273,9	369,5	593,4
A 03	598,9	356,3	346,9	550,4	359,7	482,0	449,0
A 07	472,7	548,7	663,6	321,0	488,2	415,0	484,9
A 08	458,9	719,6	215,1	67,1	--	446,7	381,5
A 10	740,6	709,2	958,9	613,9	246,0	192,4	576,8
A 21	736,0	746,7	205,5	199,4	418,0	148,7	409,1
A 28	692,4	721,6	1.183,1	493,6	506,8	506,5	684,0
A 32	467,9	1.078,4	924,8	356,3	407,1	628,0	761,4
A 35	843,6	441,6	950,6	648,7	870,7	282,1	546,3
A 38	665,8	728,8	698,8	211,2	386,5	290,1	496,9
Média	648,9	682,6	707,0	386,9	439,7	376,1	540,2
B 01	710,7	551,1	464,4	367,8	499,4	846,8	573,4
B 03	453,6	637,6	521,0	519,0	379,2	380,0	438,1
B 04	--	473,8	--	136,4	585,8	339,9	384,0
B 05	383,9	278,5	208,5	219,3	245,3	280,4	269,3
Média	516,1	485,3	398,0	310,6	427,4	461,8	433,2
C 01	637,5	575,1	407,1	520,0	290,0	509,7	500,6
C 02	--	676,7	590,8	495,3	395,0	500,6	531,7
C 03	--	610,0	277,7	213,4	168,4	308,5	315,6
C 05	600,2	268,5	205,7	272,4	281,2	516,0	357,3
Média	618,9	532,6	370,3	375,3	283,7	458,7	439,9
E U1	870,1	891,6	620,4	423,4	316,7	520,2	728,5
Média Geral	663,5	648,0	523,9	374,0	366,9	454,2	505,1

APÊNDICE 13 - Resultados da avaliação da produção comparativa de calo em peso seco médio (mg) por clone e grupos de clones por cultura

Clone	Cultura nº						Média
	6	7	8	9	10	11	
A 01	116,5	105,5	121,8	72,7	47,3	63,6	87,9
A 03	103,9	61,0	75,3	80,5	57,1	61,5	73,2
A 07	78,5	98,6	121,0	64,4	48,4	58,0	78,2
A 08	68,7	79,5	35,5	12,2	--	58,6	50,9
A 10	94,2	99,2	118,7	61,8	40,1	21,8	72,6
A 21	74,0	97,8	31,7	34,0	63,8	21,6	53,8
A 28	100,1	84,5	123,8	69,8	67,2	74,3	68,6
A 32	66,1	96,5	110,3	66,4	48,7	60,6	74,8
A 35	107,4	93,5	133,8	83,7	97,3	24,2	73,8
A 38	98,2	103,1	105,2	37,0	64,2	46,9	75,8
Média	90,8	91,9	85,8	58,3	58,2	49,1	72,4
B 01	111,6	92,0	75,4	54,9	64,4	91,9	81,7
B 03	94,4	102,2	110,1	99,7	65,9	66,9	89,9
B 04	--	67,6	--	22,2	66,5	60,0	37,5
B 05	61,8	42,2	31,0	35,0	35,8	35,2	40,2
Média	89,3	76,0	72,2	53,0	58,7	63,5	64,0
C 01	98,4	94,1	71,0	80,4	49,4	68,2	77,5
C 02	--	95,2	98,8	91,4	51,3	73,5	82,0
C 03	--	72,4	45,2	36,2	25,4	42,8	44,4
C 05	91,4	50,7	44,0	52,9	52,7	73,4	60,9
Média	94,9	78,1	64,8	65,2	44,7	64,5	82,4
E U1	118,0	103,4	76,2	56,3	49,0	61,9	93,0
Média Geral	98,3	87,4	74,8	58,2	52,7	59,8	71,9

APÊNDICE 14 - Resultados da avaliação da produção comparativa de calo através da porcentagem do peso seco por clone e grupos de clones por cultura

Clone	Cultura nº						Média
	6	7	8	9	10	11	
A 01	14,3	13,6	13,2	17,9	17,3	17,2	15,6
A 03	17,3	17,1	21,7	14,6	15,9	12,8	16,6
A 07	16,6	18,0	18,2	20,1	9,9	14,0	16,1
A 08	15,0	11,0	16,5	18,2	--	13,1	14,8
A 10	12,7	14,0	12,4	10,1	16,3	11,3	12,8
A 21	10,1	13,1	15,4	17,1	15,3	14,4	14,2
A 28	14,5	11,7	10,5	14,1	13,3	14,7	13,2
A 32	14,1	8,9	11,9	18,6	12,0	9,6	12,5
A 35	12,7	21,2	14,1	12,9	10,0	8,6	13,3
A 38	14,7	14,1	15,1	17,5	16,0	16,2	15,6
Média	14,2	14,3	14,9	16,1	14,0	13,2	14,5
B 01	15,7	16,7	16,2	14,9	12,9	10,9	14,6
B 03	20,8	16,0	23,7	19,2	17,4	17,6	19,1
B 04	--	14,3	--	16,3	11,4	17,7	14,9
B 05	16,1	15,2	14,9	16,0	14,6	12,6	14,9
Média	17,5	15,6	18,3	16,6	14,1	14,7	15,9
C 01	15,4	16,4	17,4	15,5	17,0	13,4	15,9
C 02	--	14,1	16,7	18,5	13,0	14,7	15,4
C 03	--	11,9	16,3	17,0	15,1	13,9	14,8
C 05	14,8	18,9	21,4	19,4	18,7	14,2	17,9
Média	15,1	15,3	18,0	17,6	16,0	14,1	16,0
E U1	13,6	11,6	12,3	13,3	15,5	11,9	13,0
Média Geral	15,1	14,2	15,9	15,9	14,9	13,5	14,9

APÊNDICE 15 - Resultados da avaliação da produção comparativa de calo através da taxa de crescimento do peso fresco e do peso seco por grupos de clones por cultura

Grupo de Clone	Cultura nº						Média
	6	7	8	9	10	11	
Peso fresco:							
A	13,8	19,4	20,1	11,0	12,5	10,7	14,6
B	17,5	13,7	11,3	8,8	12,1	13,1	12,8
C	17,6	15,1	10,5	10,7	8,1	13,0	12,5
E U1	24,7	25,3	17,6	12,0	9,0	14,8	17,2
Média	18,8	18,4	14,9	10,6	10,4	12,9	14,3
Peso seco							
A	19,7	20,0	18,7	12,7	12,7	10,7	15,8
B	19,4	16,5	15,7	11,5	12,8	13,8	15,0
C	20,6	17,0	14,1	14,2	9,7	14,0	14,9
E U1	25,7	22,5	16,6	12,2	10,7	13,5	16,9
Média	21,4	19,0	16,3	12,7	11,5	13,0	15,7

A B R E V I A Ç Õ E S

ADP	adenosina 5'-difosfato
AMP	adenosina 5'-monofosfato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
6 BAP	6-benzilaminopurina
CDP	citidina 5'-difosfato
CMP	citidina 5'-monofosfato
CTP	citidina 5'-trifosfato
DNA	ácido deoxiribonucleico
dADP	deoxiadenosina 5'-difosfato
dATP	deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCDP	deoxicitidina 5'-difosfato
dCTP	deoxicitidina 5'-trifosfato
dGDP	deoxiguanosina 5'-difosfato
dQTP	deoxignanosina 5'-trifosfato
dTDP	deoxitimidina 5'-difosfato
dTMP	deoxitimidina 5'-monofosfato
dTTP	deoxitimidina 5'-trifosfato
dUDP	deoxiuridina 5'-difosfato
dUMP	deoxiuridina 5'-monofosfato
GDP	guanosina 5'-difosfato
GMP	guanosina 5'-monofosfato
GTP	guanosina 5'-trifosfato
mRNA	RNA mensageiro
NDP'S	nucleosídeos 5'-difosfato
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossômico
tRNA	RNA de transferência
UDP	uridina 5'-difosfato
UMP	uridina 5'-monofosfato
UTP	uridina 5'-trifosfato