EFEITO DE ESTERÓIDES NO CRESCIMENTO

"in vitro" DE HÍBRIDOS DE *Eucalyptus*

VANDA BARBOSA DOS REIS TOTH

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luz de
Queiróz da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre Ciências Florestais.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1991

EFEITO DE ESTERÓIDES NO CRESCIMENTO

"in vitro" DE HÍBRIDOS DE *Eucalyptus*

VANDA BARBOSA DOS REIS TOTH

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. ANTÔNIO NATAL GONÇALVES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre Ciências Florestais.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro - 1991

EFEITO DE ESTERÓIDES NO CRESCIMENTO

"in vitro" DE HÍBRIDOS DE *Eucalyptus*

VANDA BARBORA DOS REIS TOTH

Aprovada em: 04.02.92

Comissão Julgadora:

Antonio Natal Gonçalves

ESALQ/USP

Hilton Thadeu Zarate do Couto

ESALQ/USP

Marcia Regina Brochetto Braga

UNESP

Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Orientador

"O problema"

"A mera formulação de um problema é, com frequência, muito mais importante do que a sua solução, a qual pode depender apenas da habilidade matemática ou destreza experimental.

Levantar novas questões, novas possibilidades, tratar velhos problemas sob um novo ângulo, isto sim, exige imaginação criadora e assinala avanços reais no campo da ciência."

Albert Einstein

O grande mérito de um cientista a si mesmo é: ser capaz de elaborar uma hipótese e obter na natureza sua solução.

Toth

DEDICO,

A minha mãe, sem a qual
eu não poderia caminhar
rumo aos meus objetivos.

IGHOR e INGRID
pela tolerância da minha
ausência em suas vidas.

Paulo, pela liberdade
aos meus ideais ...

Deus!
por permitir aos homens
que encontrem-O
na evolução de TUDO ...

AGRADECIMENTOS

- A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPQ, pelo suporte financeiro.
- Ao Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves, pela grande amizade, orientação e uso do laboratório.
- Ao Prof. Dr. Hilton Thadeu Zarate do Couto, pela orientação nas análises estatísticas, leitura da tese e amizade.
- A Chamflora Agrícola Ltda, pela doação do material a ser propagado e, principalmente pelo apoio da amiga Diva Correia. Aos Eng^{os} Florestais José Demetrius Vieira e Luís Moro, pela colaboração de material xerox e suporte financeiro para elaboração da tese.
- A Dr^a Helena F. Baptistella, pela doação de esteróides e as Dr^a Márcia Calori e Dr^a Sônia Cristina Jeronimo, pelo fornecimento de vitaminas.
- Ao Prof. Nilson Augusto Villa Nova, pelas sugestões na determinação da quantidade de luz dos ensaios.

- A amiga Silvia Cristina Vetorazzo a quem apoiou-me nos momentos mais difíceis da elaboração desta tese, contribuindo com seus conhecimentos e com sua amizade.
- Ao Milton César Ribeiro, pela colaboração nas análises estatísticas.
- A Nelma Reis, pela ajuda no laboratório e a rotina do dia-a-dia, paciente e amiga, ao Mário, Márcio e Maurício pelo auxílio prestado pelos trabalhos de xerox.
- A todos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, especialmente ao Técnico José Roberto Romanini, pelo apoio durante o desenvolvimento da pesquisa.
- Aos amigos e colegas do Departamento e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos Gerais da Cultura "in vitro" de Eu- calipto	3
2.2. Pontos de Controle na Ação dos Reguladores de Crescimento	6
2.3. Esteróides e Esteróis	7
2.4. Auxinas	11
2.5. Citocininas	15
2.6. Vitaminas	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Origem das Plantas Matrizes	23
3.2. Propagação das Estacas	24
3.3. Propagação do Material "in vitro"	24
3.4. Meio de Cultura e Condições Ambientais	27
3.5. Propagação de Explantes após 18 ^o Subcultivo	27
3.6. Experimentos Realizados	30

3.6.1. Ensaio I - Influência de Diferentes Concentrações de Esteróides e Associação com AIA no Alongamento e Enraizamento das Brotações	30
3.6.2. Ensaio II - Influência de Diferentes Concentrações de Esteróides e Associação com 6-BAP e AIA + 6-BAP na Indução de Brotações	31
3.7. Análises Estatísticas dos Dados para Ensaio I e II	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Resultados do Ensaio I - Efeito da Interação Esteróide e Associação com AIA, no Alongamento e Enraizamento das Brotações	33
4.1.1. Resultados para diferentes clones (H1 - H2 - H3 - H7 - H8 e H9)	35
4.1.2. Resultados para diferentes tratamentos hormonais (T0 - T1 e T3)	37
4.1.3. Resultados de diferentes concentrações hormonais (0 - 1 - 2 - 3 e 4) ..	44
4.1.4. Resultados das interações: clone x hormônio; clone x concentração e hormônio x concentração	47

4.2. Resultados do Ensaio II - Efeito da Interação Esteróide em Associação com 6-BAP e 6-BAP + AIA	52
4.2.1. Resultados para os diferentes clones (H1 - H2 - H3 - H7 - H8 e H9)	53
4.2.2. Resultados para os diferentes tratamentos hormonais (T0 - T2 e T4) no Ensaio II	56
4.2.3. Resultados de diferentes concentrações de esteróides no Ensaio II	61
4.2.4. Resultados das interações: clone x hormônio; clone x concentração e hormônio x concentração no Ensaio II ...	63
4.3. Discussões Finais	65
4.3.1. Ensaio I	65
4.3.2. Ensaio II	66
5. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICE	80

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Porcentagem de sobrevivência entre os diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.	36
2	Número médio de brotações dos diferentes clones em função das diferentes concentrações de esteróides no Ensaio I.	40
3	Altura média das brotações (cm) dos diferentes clones, face as concentrações de esteróides no Ensaio I.	41
4	Produção de matéria fresca da parte aérea das brotações - MFPA - (mg) dos diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.	42
5	Produção de matéria seca da parte aérea das brotações - MSPA - (mg) dos diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.	43
6	Número médio de raízes das brotações dos diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.	44
7	Comprimento médio das raízes (cm) oriundas das brotações de diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.	47

Figura		Página
8	Produção média de matéria fresca das raízes - MFR - (mg) dos diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.	50
9	Produção média de matéria seca das raízes - MSR - (mg) dos diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.	52
10	Porcentagem de sobrevivência entre os diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio II.	54
11	Número médio de brotações dos diferentes clones em função das diferentes concentrações de esteróides no Ensaio II.	55
12	Altura média das brotações (cm) dos diferentes clones, face as concentrações de esteróides.	56
13	Produção de matéria fresca da parte aérea das brotações - MFPA - (mg) dos diferentes clones e concentrações de esteróides.	58
14	Produção de matéria seca da parte aérea das brotações - MSPA - (mg) dos diferentes clones e concentrações de esteróides.	59

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
1	Descrição de árvores matrizes utilizadas no experimento.	26
2	Características silviculturais das árvores matrizes e respectivos tipos de solos e clima.	27
3	Descrição dos tratamentos e suplementações utilizadas no Ensaio I e a composição de cada meio.	30
4	Descrição dos tratamentos e suplementações utilizadas no Ensaio II e a composição de cada meio.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela		
1	Resultados aos 30 dias das análises de variância e do teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para os diferentes clones no Ensaio I (T0, T1 e T3).	34
2	Resultados aos 30 dias das análises de variância e do teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para os diferentes tratamentos hormonais no Ensaio I (T0, T1 e T3).	38

Tabela	Página
3 Resultados aos 30 dias das análises de variância e do teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para diferentes concentrações de esteróides no Ensaio I (T0, T1 e T3).	45
4 Resultados aos 30 dias das análises de variância para as interações entre clone, hormônio e concentração no Ensaio I (T0, T1 e T3).	48
5 Resultados aos 30 dias das análises de variância e do teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para os diferentes clones no Ensaio II (T0, T2 e T4).	53
6 Resultados aos 30 dias das análises de variância e do teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para os diferentes tratamentos hormonais no Ensaio II (T0, T2 e T4).	57
7 Resultados aos 30 dias das análises de variância e do teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para diferentes concentrações de esteróides no Ensaio II (T0, T2 e T4).	62
8 Resultados aos 30 dias das análises de variância para as interações entre clone, hormônio e concentração no Ensaio II (T0, T2 e T4).	64

LISTA DE ABREVIATURAS

1. AIA = Ácido-indol-acético
2. BAP = 6-BAP = 6-Benzilaminopurina
3. GA₃ = Ácido giberélico
4. ANA = Ácido naftalenoacético
5. AA = Ácido ascórbico

EFEITO DE ESTERÓIDES NO CRESCIMENTO

"in vitro" DE HÍBRIDOS DE *Eucalyptus*

Autora: VANDA BARBOSA DOS REIS TOTH

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

RESUMO

Neste estudo utilizou-se clones de híbridos de *Eucalyptus grandis* com *E. urophylla*, provenientes de brotações no 18^o subcultivo na fase de multiplicação *"in vitro"*.

Foram conduzidos dois ensaios para estudar a influência de cinco diferentes concentrações dos esteróides progesterona (P) e estradiol (E): 0,0 μM ; 0,0921 μM ; 0,1535 μM ; 0,2302 μM e 0,3070 μM , interagindo ou não com AIA (0,1 mg/l), 6-BAP (0,1 mg/l) ou AIA + 6-BAP (0,1 mg/l de cada).

No Ensaio I, a interação de esteróides (P+E) com AIA, objetivou-se a indução do alongamento e enraizamento. Para o Ensaio II verificou-se a interação de esteróides (P+E) com 6-BAP e (P+E) com 6-BAP + AIA, na indução das brotações.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, empregando seis clones, três tratamentos hormonais, cinco concentrações de esteróides e três repetições, sendo cinco brotações por frasco.

As variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência, número, altura das brotações, número e comprimento de raízes, produção de matéria fresca e seca da parte aérea e da raiz.

A análise dos resultados permitiu as seguintes conclusões:

1. A interação de progesterona e estradiol na presença de AIA, evidenciou efeitos altamente significativos no alongamento e enraizamento dos clones;
2. A interação de progesterona e estradiol com 6-BAP, mostrou efeitos altamente significativos na indução de brotações dos clones;
3. O uso de esteróides progesterona e estradiol com AIA e 6-BAP, permitiu a obtenção de plântulas rustificadas.

EFFECTS OF STEROIDS ON GROWTH OF

Eucalyptus HYBRIDS "in vitro"

Author: VANDA BARBOSA DOS REIS TOTH

Adviser: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

SUMMARY

Hybrid clones of *Eucalyptus grandis* vs. *Eucalyptus urophylla* proceeding from shoots in the 18th subculture, in the "in vitro" multiplication stage, were used in this study.

Two trials were carried out in order to study the influence of five different concentrations of progesterone (P) and stradiol (S) steroids: 0,0 μ M; 0,0921 μ M; 0,1535 μ M; 0,2302 μ M and 0,3070 μ M, interacting or not with AIA (0,1 mg/l), 6-BAP (0,1 mg/l) or AIA + 6-BAP (0,1 mg/l each one).

The induction of elongation and rooting was the objective for the first trial (steroids interaction - P+E - with AIA). For the second trial, the steroids interactions (P+E) with 6-BAP and steroids interactions (P+E) with 6-BAP + AIA were checked, in the shooting induction.

The statistical delineation was completely randomized, in the factorial scheme, using six clones, three

hormonal treatments, five steroids concentrations and three repetitions, being five shoots per flask.

The analysed variables were: surviving percentage, shoots number and height, roots number and lenght, dry and fresh matter production of shoots and roots.

The results, analysis led to the following conclusions:

1. The progesterone and stradiol interaction in the presence of AIA showed highly significant effects on the clones clongation and rooting.
2. The progesterone and stradiol interaction with 6-BAP showed highly significant effects on the clones shooting induction.
3. The use of progesterone and stradiol steroids with IAA and 6-BAP allowed the obtention of hardening plantlets.

1. INTRODUÇÃO

"Técnica é o resultado de uma necessidade. Novas necessidades demandam novas técnicas, controle total mais do acidental, e novos estados de ordem".

O emprego das técnicas de cultura de células e tecidos na propagação "*in vitro*" de *Eucalyptus* vem-se tornado uma necessidade; frente à otimização de metodologias que possam conduzir a uma compreensão melhor do comportamento biológico da espécie.

Essas técnicas devem garantir a melhoria da quantidade e qualidade dos produtos finais do eucalipto, diante da importância econômica e social que possui para o país.

O controle da morfogênese, da vitrificação, da padronização e homogeneização das culturas e sub-culturas são pontos de estrangulamento nos sistemas da micropropagação, principalmente de essências florestais.

A manipulação das condições ambientais, da composição dos meios de cultura, tanto mineral como hormonal, são práticas normalmente utilizadas no estabelecimento de culturas.

O uso de substâncias ditas "acessórias" como esteróides, saponinas e vitaminas, foram utilizadas no controle da morfogênese de plantas, nas décadas de 30 a 50. A sua reutilização na cultura de tecidos, pode representar hoje, um agente modificador de aplicabilidade das diferentes ferramentas biotecnológicas.

Diante das necessidades da micropropagação do *Eucalyptus* este trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar os efeitos da interação de cinco diferentes concentrações de progesterona e estradiol em associação com AIA no alongamentamento e enraizamento "in vitro" de brotações oriundas de diferentes clones de híbridos de *Eucalyptus*;
2. Avaliar os efeitos da interação de cinco diferentes concentrações de progesterona e estradiol em associação com 6-BAP na indução de brotações oriundas de diferentes clones de híbridos de *Eucalyptus*;
3. Avaliar os efeitos da interação de cinco diferentes concentrações de progesterona e estradiol em associação com AIA + 6-BAP no crescimento e desenvolvimento de diferentes clones híbridos de *Eucalyptus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Gerais da Cultura "in vitro" de Eucalipto

Uma rápida expansão na propagação "in vitro" de essências florestais têm ocorrido durante as duas últimas décadas.

A regeneração "in vitro", quer seja pela organogênese ou embriogênese, é hoje, uma necessidade para adequar a propagação do eucalipto e a obtenção de produtos de melhor qualidade e maior competitividade.

ANEJA & ATAL (1969) demonstraram a primeira regeneração de plântulas de eucalipto através da cultura de tecidos utilizando explantes de *E. citriodora*.

FOSSARD (1974); Trabalhando com segmentos nodais de plântulas provenientes de sementes, verificou que a adição ao meio de cultura de água de coco e caseína hidrolizada, estimulou o crescimento de raízes em *E. grandis*; para *E. bancroftii*, *E. laevopinea*, *E. melliodora*, houve estímulo de um crescimento vigoroso dos segmentos nodais. O efeito benéfico da adição de água de coco e caseína ao meio de cultura já fora observado por JACQUIOT (1964) em culturas de *E. camaldulensis*, *E. cladocalyx*, *E. dunnii*, *E. gamocephala* e *E.*

tereticornis.

Plantas regeneradas à partir de calos de hipocótilo de *E. alba* (KITAHARA & CALDAS, 1975) e de *Eucaliptus* x *Trabuti* vilmorin (MARCAVILLACA & MONTALDI, 1984) foram obtidas com a adição ao meio de cultura de extrato de levedura, ácido indol-acético (AIA) e cinetina sob temperatura constante a 25°C.

Calos de *E. botryoides*, estames de cotilédones de *E. marginata* de folhas de ramos axilares de *E. camaldulensis*, regeneraram plantas nos trabalhos de ZHANG *et alii* (1982); BENNET & McCOMBI (1982) e MURALIDHARAM & MASCARENHAS (1987), respectivamente.

FURZE & CRESSWELL (1985) micropopagaram *E. grandis* e *E. nitens*, em diferentes meios de cultura contendo zeatina, cinetina, benziladenina (BAP), ácido gibérico (GA), ácido naftalenacético (ANA) e ácido-indol-acético (AIA) em diferentes concentrações. Verificou-se que o meio de BOYLAY (1983) apresentou o melhor resultado com uma porcentagem de enraizamento de 90% para *E. grandis* e 80% para *E. nitens*.

FOSSARD *et alii* (1977) utilizando cultura nodal de quatro diferentes espécies de eucaliptos (*E. grandis*, *E. regnans*, *E. polibractea* e *E. ficifolia*), obtiveram brotações vigorosas. O melhor crescimento dentro das concentrações testadas foi apresentado por *E. ficifolia*.

DAS & MITRA (1990) propagaram diferentes tipos de explantes de *E. tereticornis* Smith, oriundos de árvo-

res adultas, selecionadas aos 8-10 anos de idade e de 3 diferentes regiões. Os resultados mostraram que o máximo de indução das brotações foram obtidos quando ao meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) foi adicionados 1,0 mg/l de BAP e 0,1 mg/l de ANA. A melhor porcentagem de enraizamento, cerca de 80-80% dos explantes foi obtida através do meio KNOP (1984) com 1,0 mg/l de IBA. Os autores consideram que o fator responsável por este alto índice de enraizamento foi a incubação das culturas no escuro no período inicial.

GONÇALVES (1982) desenvolveu uma metodologia de reversão à juvenilidade, em que brotações oriundas de gemas de árvores adultas de *E. urophylla* foram transferidas sucessivamente em um meio de multiplicação para um de enraizamento. Foi observado variação entre e dentro do grupo de clones de diferentes idades e procedências para a multiplicação e o enraizamento das gemas.

RAO & VENKATESWARA (1985) analisaram o desenvolvimento de raízes em explantes procedentes de árvores jovens e adultas estabelecidas em três diferentes meios de cultura à partir dos sais de MURASHIGE & SKOOG (1962). Mostraram que 80% dos explantes de árvores jovens enraizaram, enquanto que apenas 35% dos explantes de árvores adultas apresentaram raízes.

2.2. Pontos de Controle na Ação dos Reguladores de Crescimento

Os reguladores de crescimento, hormonais ou não, são fatores importantes na propagação clonal de muitas espécies vegetais. Atualmente, há uma preocupação voltada ao estudo do comportamento fisiológico, molecular e principalmente das teorias dos pontos de controle interno dessas substâncias.

Durante a segunda metade do século, Julio Sachs, acreditava ser o crescimento e desenvolvimento, variáveis dependentes de "substâncias controladoras de órgãos". Haveria uma distribuição local e específica, sujeita a influências ambientais. Embora haja extensa literatura sobre a indução e diferenciação celular na cultura de tecido de plantas, poucas evidências sobre o controle interno têm sido publicadas (VALIO, 1988).

A aplicação exógena de hormônios em doses adequadas ou de outras substâncias, como aminoácidos, esteróides, poliaminas podem levar a uma proliferação celular, enquanto, outras doses consideradas inibidoras desses mesmos produtos podem levar à uma diferenciação (SETHI & MUKHERJEE, 1990).

A fase inicial do mecanismo de diferenciação celular é controlada por hormônios específicos em sítios alvos espalhados por toda célula. A dinâmica das membranas às quais os hormônios estão envolvidos deve ser melhor com-

preendida. A entrada e mobilidade dessas substância induz à interações, implicam em ações biológicas com os seus receptores, no transporte de elétrons e de todos os mecanismo que promovam "colisões" para operar e regular (HOUSLAY & STANLEY, 1990).

TREWAVAS (1981) discute sobre a sensibilidade e adaptação sensorial de respostas as quais essas substâncias controladoras de crescimento produzem. Há diferença entre uma substância verdadeiramente regulatória e outra essencial em sua ação. A sensibilidade da substância de crescimento é o "prime", a primeira variável de controle e desenvolvimento da planta. Esta altera desde o início o número de receptores para uma determinada resposta (TREWAVAS 1981; 1982; 1983).

Dentre os pontos de controle, REID & MURFFET (1977) enfocam a importância da ação gênica via hormonal. Um simples gene pode causar uma multiplicidade de efeitos pleiotrópicos. As mutações parecem influenciar o nível hormonal, regular a biossíntese e promover mudanças no comportamento fisiológico e até em características genotípicas da espécie.

2.3. Esteróides e Esteróis

Durante as décadas de 30 a 50, muitos pesquisadores utilizaram saponinas, substâncias "acessórias" não consideradas hormonais, para avaliar sua ação como agente de

proliferação celular, crescimento vegetativo, florescimento, alterações a nível de pigmento clorofiliano, germinação e desenvolvimento de plantas.

Quimicamente, FILSER & FILSER (1958), definiram os esteróides como sendo um grupo de álcool secundário de 27 a 29 carbonos, o qual difere de um álcool comum, de origem animal ou vegetal. É um sólido cristalino à temperatura ambiente. Possuem 1, 2-ciclopentanofenantreno, consistindo de um arranjo de quatro anéis denominados A, B, C e D.

O maior esteróide de origem animal e vegetal possui um grupo 3- β -hidroxi secundário, um grupo de 10 a 13 carbonos angulares e de oito a dez carbonos na cadeia do lado do C17. Os dois grupos metil e a cadeia do lado são também β -orientados. Com raras exceções, os esteróides ocorrem naturalmente e têm pelo menos uma dupla ligação, normalmente no anel B. As estruturas que formam o maior esterol em plantas superiores são denominadas: sitosterol, campesterol e estigmasterol. Colesterol é uma estrutura encontrada em poucas quantidades em muitas plantas e de grande importância fisiológica nas células animais (DÉFAGO *et alii*, 1969).

HEFFMANN (1963) revisou extensamente a literatura sobre os esteróis em plantas. Estudos na área de bioquímica e fisiologia de fitoesteróides têm sido elaborados e grandes progressos obtidos sobre sua via biossintética.

Segundo GRUNWALD (1976), os esteróides podem atuar de dois modos: (1) agindo como hormônios ou mais precisamente serem precursores destes, ou (2) estar envolvidos

na estrutura de arranjo das membranas.

GRUNWALD (1968), avaliou o efeito de esteróis sobre a permeabilidade de células de raízes de *Beta vulgaris* tratando-as com álcool. Este, em baixas concentrações aumenta a permeabilidade das células, age a nível das membranas, influenciando a interação fosfolipídica com o esterol. O efeito do álcool foi inibido por CaCl_2 , colesterol, β -sitosterol e estigmasterol, sendo o colesterol o mais eficiente e potente na proteção das membranas.

SIEGEL *et alii* (1964) consideram que o álcool envolve não apenas os sítios aniônicos, mas que a interação do esterol com fosfolipídeos, causa uma espécie de "abertura" na configuração da membrana, aumentando sua permeabilidade.

O estradiol pode ser um complemento de membrana com capacidade de alterar as características de permeabilidade da mesma. SPIEGEL *et alii*, (1978) demonstraram que o efeito foi evitado pela adição de progesterona.

O dietilestilboestiol (DES), um estrógeno sintético mais efetivo em animais do que o estradiol, foi um substituto encontrado para estimular o crescimento em *Raphanus sativus*, *Lepidium sativum* e *Quena sativa* (SHULT & COX, 1972). BALKE & HODGES (1975, 1979a) verificaram que em raízes de aveia o DES inibiu a absorção e a apreensão de K^+ e houve aumento do fluxo deste íon através do tonoplasto e do plasmalema.

Conteúdos de esterol podem afetar a permeabilidade de bicamadas artificiais nas membranas (BENZ & CROS, 1978). Em membranas de plantas, os níveis de esteróis são controlados por fatores genéticos e ambientais. Postula-se que o esterol age no controle da eficiência de apreensão de nutrientes através de raízes. Ambos são mecanismos de transporte e de adaptação às condições adversas e ambientais (KUIPER & KUIPER, 1978).

Efeitos exógenos de estrógenos detectados em diferentes experimentos foram na grande maioria sobre o crescimento vegetativo e florescimento de plantas. Na década de 40, hormônios preparados e vendidos comercialmente como o "Proginon", foram extensamente utilizados em plantas ou mesmo aqueles preparados à partir de extratos foliculares de cobaias. SCHOELLER & GOEBEL (1932) apresentaram resultados discrepantes entre o progynon comercial e o extraído do hormônio folicular em *Calla octhiopica*.

LOVE & LOVE (1945), observaram que aplicação de estrógenos exógenos estimularam a divisão celular em raízes de diferentes espécies de plantas, bem como a germinação de pólen e de sementes, indicando ter ocorrido um possível aumento nos conteúdos de ácidos nucleicos.

O período de máxima produção de estrógeno endógeno tem sido detectado no florescimento de plantas, sob diferentes fotoperíodos e condições ambientais (KOPCEWICZ, 1972a; 1971b; 1971; 1973c; 1972b).

LESHEM (1967) verificou que, o estradiol estimulou a formação de raízes em estacas de segmentos de inflorescência de brócolis nas doses de 3 e 50 ppm, mas não a 25 ppm.

Estudos de esteróides têm sido conduzidos com sucesso através da cultura de calos e em suspensão, visando investigar o potencial biossintético e metabólico da cultura de tecidos relacionados aos esteróides. Basicamente, estas avaliações podem ser feitas de três modos: (1) isolamento e identificação de esteróides produzidos por culturas de calo e em suspensão; (2) utilização da cultura de tecidos vegetais para estudar vias biossintéticas de esteróides, frequentemente empregando precursores radioativos, e (3) incubação de tecidos cultivados "in vitro" com substratos esteroidais para investigar os sistemas enzimáticos envolvidos com os esteróides (STOHS & ROSENBERG, 1975).

O colesterol, um dos principais esteróides, têm sido encontrados em culturas de calos de *Sesamum indicum*; *Discorea tokocoro* e *D. deltoidea* (TOMITA et alii, 1970) e *Yucca glauca* (STOHS & ROSENBERG, 1975) embora tenha sido detectadas pequenas quantidades, quando comparados aos demais esteróides.

2.4. Auxinas

A auxina é um hormônio de ampla ocorrência no reino vegetal; regulador do crescimento e desenvolvimento em

plantas é encontrado, principalmente, em órgãos em crescimento ativo, regiões meristemáticas, folhas jovens, coleóptiles e sementes (WETMORE & JACOBS, 1953).

Quimicamente, acredita-se que a auxina se ligue a receptores por meios puramente físicos, sendo fundamental suas forças eletrostáticas e de atração entre as superfícies da auxina e o seu receptor (WILDMAN *et alii*, 1947).

O sítio de biossíntese é inicialmente à partir do triptófano, sendo a sua velocidade de síntese influenciada por fatores ambientais. Nas plantas perenes, a auxina ocorre em concentrações superiores durante os períodos de primavera e verão.

A ação dos hormônios e sua biossíntese está relacionada com efeitos de íons divalentes, fatores ambientais, e a própria ação de outras substâncias não "hormonais" (RAPPAPORT, 1980).

Para TREWAVAS (1982) existe uma correlação entre a resposta da planta e a quantidade de AIA ou seu "turnover" que está relacionada com o número de sítios e suas atividades, de biossíntese, bem como a conexão entre ambos.

O transporte do AIA de um local para outro, pode ser polar, da ponta da extremidade para a base da coleóptile; assimetralmente pelo estímulo trópico, envolvendo a movimentação da auxina do estele vascular, rodeando os tecidos corticais (NOWACKI & BANDURSKI, 1980).

JACOBS & GILBERT (1983) levantam a hipótese de que uma proteína possa estar envolvida neste transporte, localizada na base da célula, que se liga aos inibidores do AIA e não a este, ou duas proteínas envolvidas: uma no mecanismo de carregador e outra de inibidor.

A auxina promove reações em cascata permitindo que a planta cresça. Há rápidas mudanças dentro da célula afetando o comportamento dos mRNA's, da permeabilidade da membrana, do pH e da atividade das enzimas (REINECKE & BANDURSKI, 1986).

A expansão celular consiste em dois processos: osmótico e de estresse. O primeiro regula o potencial de gradiente da água, através da membrana do plasma e o segundo ocorre na extensão da área da parede, exercida pelo turgor, gerado pelo estresse, CLELAND, 1981 e 1983. Ambos processos ocorrem juntos, para que haja um rendimento na extremidade da parede e na expansão da célula; agem combinados, para que a velocidade de crescimento se mantenha VESPER, (1985). A parede celular consiste de um emaranhado de polissacarídeos e quando sob tensão, comporta-se como um material visco-elástico e se estende até um limite máximo. Há uma clivagem bioquímica e a auxina promove a extensão e a velocidade de síntese (TAIZ, 1984).

A auxina regula o pH da parede celular (através da extrusão de prótons), e as enzimas que causam desprendimento da parede, ativando a expansão celular (CLELAND, 1971).

O nível de auxina nos tecidos vegetais é um fator limitante e controlador da regeneração do floema e xilema (MORRIS & THOMAS, 1978). O floema é induzido através de baixos níveis de AIA, enquanto a diferenciação do xilema, exige altos níveis (THOMPSON & JACOBS, 1966).

Em cultura de tecido o floema não diferencia muito do xilema e a formação de ambos requerem altas concentrações de AIA. No entanto, o xilema induzido por diferenciação de altos níveis de AIA, transforma-se em um floema anastomosado, isto é, floema e xilema junto (ALONI & JACOBS, 1977).

Segundo ALONI & SACHS (1973), o aumento no tamanho dos vasos e no diâmetro destes, baseia-se no equilíbrio da auxina que flui das folhas para as raízes, controlando as mudanças polares no tamanho dos vasos e no diâmetro do eixo das plantas. A organização tridimensional das fibras vasculares ao longo do caule, pode ser explicada através da canalização do AIA, o que resulta no desenvolvimento polar, no transporte, promovendo diferenciação vascular dos tecidos. O transporte não polar do floema promove uma diferenciação vascular nos instantes de curvatura e serve como um mecanismo adicional, regulando a vascularização na região de inclinação.

2.5. Citocininas

As citocininas são substâncias reguladoras do crescimento que afetam a divisão celular.

SKOOG *et alii* (1967), trabalhando com cultura "in vitro" de tecidos de tabaco, evidenciaram muitos aspectos da ação das citocininas na diferenciação celular. Observaram que os segmentos da medula não cresciam em meio básico (MS), mas com a adição de cinetina havia promoção do crescimento do tecido durante a divisão celular da medula; quando havia remoção do cortex, cessava o crescimento destes segmentos.

A ação biológica da citocinina (Teoria do arranjo conformacional dos reguladores com seus receptores) não está relacionada apenas aos grupos estruturais entre si, mas às propriedades conformacionais da molécula, permitindo uma interação com os seus receptores celulares (LETHAN & PALNI, 1983).

Numerosas estruturas dentro da célula vegetal como a parede celular, membranas, núcleo, mitocôndrio, cloroplastos, são possíveis sítios de ação da citocinina. Estes sítios promovem modificações a nível de parede, que interferem com os fenômenos de expansão celular, envolvendo mudanças na permeabilidade, e agem sobre membranas alterando processos metabólicos específicos. Juntamente com as enzimas estes sítios alteram propriedades, funcionando como co-fatores ou inibidores, modificando a síntese protéica, alterando

a nível nuclear a transcrição ou a tradução gênica (CHEN & HALL, 1969).

As regiões meristemáticas das raízes são os locais sede da síntese de citocininas. SITTON *et alii* (1967) avaliou níveis de citocininas em raízes de ervilhas e altas concentrações foram detectadas no primeiro milímetro da coifa da raiz. O suprimento de citocininas para as folhas e gemas controla o desenvolvimento e a senescência. Isto está de acordo com observações de outros autores, de que as raízes são necessárias para manter os níveis de clorofila e de proteína durante o ciclo de vida.

Níveis de citocininas em folhas destacadas de *Pereskia*, caem, quando as raízes não se formam e senescem em quinze dias, o que não ocorre em folhas destacadas e que formaram raízes. A forma estrutural das plantas podem estar relacionada com as citocininas, bem como a síntese de clorofila e a interferência dos processos de morfogênese (SITTON *et alii*, 1967).

Segundo LAW & HAMILTON (1985), as cinetinas possuem efeito inibitório sobre algumas enzimas como as nucleases e proteases. Isto poderia explicar a manutenção da síntese protéica a nível de RNA e aumento no DNA em tecidos tratados com citocininas. De alguma forma essas substâncias podem aumentar ou inibir o efeito promotor do AIA no crescimento.

GOODWIN & MORRIS (1979) trabalhando com aplicação de fitohormônios em raízes de ervilha com ápices re-

movidos, para avaliar o efeito de ramificação lateral, demonstrou a existência de uma relação inversa entre auxina e citocininas, tanto em raízes quanto em brotações submetidas ao crescimento. As auxinas são sintetizadas nos ápices das brotações, enquanto as citocininas são sintetizadas nas raízes; estas inibem a iniciação lateral das raízes e promovem o crescimento lateral do caule. Estes experimentos estão de acordo com muitos outros relatos na literatura de que AIA e ANA promovem raízes laterais quando AIA é aplicado nas brotações ou raízes de plantas intactas (McDAVID *et alii*, 1972).

HEWETT & WAREING (1973) consideram que as mudanças ocorridas durante a produção de citocininas, podem ser induzidas por fatores ambientais, responsáveis em potencial pelos aspectos do desenvolvimento em muitas plantas. O transporte e a quantidade de citocininas levadas das raízes até as brotações é um sinal de que as mudanças ambientais estão correlacionadas com a velocidade e as características de crescimento das plantas.

BURROWS & CAR (1969) e ITAI & VARDIA (1965) observaram que o excesso e a deficiência de água nas plantas causam diminuição dos níveis de citocininas existentes nos conteúdos das seivas.

O pH é outro fator responsável pela qualidade e quantidade de citocinina liberada. No pH 5.8, que foi considerado ótimo por STADEN & WARREING (1972), houve uma relação inversa entre quantidade de citocinina produzida e a

atividade da oxidase. Provavelmente, esta dependência está ligada aos níveis de oxigênio dentro das células. Há um indício de que com o aumento do número de raízes haja uma redução na concentração de oxigênio do meio e nos níveis de citocinina, influenciando as reações de síntese que parecem depender da disponibilidade do oxigênio.

KODA & OKAZAWA (1978), notaram que aumentando a intensidade luminosa havia uma elevação na quantidade de citocininas em ápices radiculares de tomate cultivados "in vitro", estimulando um maior crescimento de raízes. A aeração e a agitação, também estimularam a produção de citocinina e promoveram o crescimento de raízes.

AUNG & STEFFENS (1990) observaram respostas no crescimento e na formação de brotações em seedlings de *Lycopersium* submetidas a tratamentos com thidiazuron (TDZ) e 6-benziladamina (BA). O tratamento com TDZ foi altamente ativo na promoção de diferentes calos. A média de crescimento para TDZ foi menor que a induzida pelo BA, mas este promoveu maior tamanho nas brotações. Em relação ao estímulo provocado no diâmetro das brotações, TDZ e BAP mostraram resultados semelhantes.

2.6. Vitaminas

As vitaminas são compostos orgânicos, necessários às plantas e animais em quantidades da ordem de miligramas ou microgramas. Funcionam como componentes essenciais

de coenzimas específicas que participam no metabolismo e em atividades especializadas. São classificadas em 2 grupos hidrossolúvel e lipossolúvel. Após a década de 30, muitos pesquisadores como STOWE (1958, 1961), STOWA & DOTTS (1971); STOWE & OBREITER (1959), voltaram seus interesses para o estudo do comportamento das vitaminas "C" e "E" nas plantas.

Embora, as plantas possuam habilidade para sintetizar vitaminas, através de reações com CO_2 , NH_3 e H_2S , pequenas moléculas são encontradas dentro de coenzimas, participando de processos fisiológicos.

A vitamina "C" (ácido ascórbico) possui função de cofator de algumas reações de hidroxilação, e a vitamina "E" (α , β e γ tocoferol) não têm função definida, mas provavelmente participa na prevenção do ataque do oxigênio sobre os lipídeos das membranas celulares (LEHNINGER, 1985).

As plantas superiores e os animais podem sintetizar ácido ascórbico (AA) à partir de glicose. O ácido ascórbico têm sido frequentemente incluído em meio de cultura "in vitro" para crescimento de algas e culturas em suspensão de plantas. Sob condições "in vitro" o ácido ascórbico tem demonstrado atuar como um agente antioxidante, diminuindo o efeito deletério do escurecimento dos tecidos e associados à um baixo crescimento.

WICKERS *et alii* (1984), consideram que a vitamina "C" possa inibir ação de oxidação e escurecimento em plantas. A enzima polifenol oxidase possui um substrato de amplo espectro, específico, que age a nível de duas reações

catalizando a hidroxilação de monofenóis e ortodiquinonas com posterior oxidação dessas quinonas.

ELMORE *et alii* (1990), estudando a estabilidade do ácido ascórbico (AA) em três diferentes meios de cultura (BROWN, KNUDSOM, e MURASHIGE & SKOOG) e em água deionizada, verificaram que após 50 minutos da adição do AA houve reduções detectáveis diferentemente para cada tratamento. As diferenças nas taxas de redução podem ser atribuídas à diferentes concentrações de Cu^{2+} e Fe^{3+} , que catalizam a oxidação do ácido ascórbico. Os resultados dos experimentos que testaram os efeitos da variação do pH (4,5-7) no meio mostraram que elevando o pH houve maior redução do ácido ascórbico. No experimento com autoclavagem dos meios observou-se uma acentuada aceleração da taxa de degradação do AA. A intensidade luminosa variando de 0-8,05 W.m^{-2} não afetou a taxa de redução do ácido ascórbico, mas 18,1 W.m^{-2} acelerou ligeiramente esta degradação.

Ainda, segundo o autor, a rápida oxidação do ácido ascórbico pode não exercer efeito diretamente como uma molécula intacta ou permanecer no meio como um subproduto (ácido desidroascórbico) por muito tempo e ser absorvido pelos tecidos inoculados e voltar a ser reduzido à ácido ascórbico. Por outro lado, os efeitos de oxidação poderão ser mediados através de algum subproduto de novas reações.

A vitamina E (α , β e γ tocoferol) está no grupo de substâncias solúveis em gorduras e de todos os derivados das unidades de isopreno. Ocorrem em óleos

oriundos de grãos de trigo, milho e a forma biologicamente mais ativa é o α -tocoferol, 5, 7, 8-trimetil-tocol.

SIRONVAL (1948) realizaram experimentos para avaliar a influência da vitamina E no florescimento de *Fragaria vesca* L. var. *sempreflorens* Duck. Esta espécie é sensível a dias longos, pois em condições de dias curtos não alcançam estágio reprodutivo. Os resultados mostraram que em plantas de dias com 16 horas, as frações de vitamina E são duas vezes mais altas que em dias curtos com 8 horas. Em relação à produção de matéria seca, as diferenças foram mais significativas.

O crescimento de segmentos nodais de plantas de ervilhas na presença de AIA e GA_3 foi consideravelmente aumentado, quando foram adicionados pequenas quantidades de vitamina E, K_1 . Estas substâncias parecem ativar o sistema do citocromo fazendo ocorrer um sinergismo com auxina e GA_3 (STOWE, 1958 e 1959, 1971).

Segundo STOWE & OBREITER (1959) lipídios de origem de ácidos graxos e vitaminas do tipo isoprenóides (D_2 , E e K_1), podem, em quantidades mínimas mascarar ou aumentar a ação das auxinas e giberelinas, de diferentes formas: vitamina E em associação com auxina em baixas concentrações, estimulam o crescimento de segmentos nodais; quando associada ao ácido giberélico promove florescimento e crescimento.

TANCZOS et alii (1982) estudaram o efeito da aplicação de α -tocoferol na fisiologia de seedlings de

arroz. A aplicação de α -tocoferol resultou na estimulação de brotação em 17,5% numa temperatura subótima de 13°C/8°C nos regimes dia/noite. A avaliação do crescimento foi acompanhada pela estimulação da absorção de K^+ pelas raízes e pela estimulação da atividade da ATPase pelo Ca^{++} nas membranas celulares das raízes. A aplicação de α -tocoferol também resultou em aumento da fluidez da membrana, que foi explicado como um efeito de desordenação estrutural do α -tocoferol nas membranas celulares de seedlings de arroz.

Segundo Cormier¹, citado por NKANKA (1982), a vitamina E é um excelente antioxidante "in vivo" e "in vitro", protegendo as membranas da oxidação dos ácidos graxos.

NKANKA (1981) avaliou o número de subcultivos necessários para obter o máximo de enraizamento com a vitamina E, utilizando o meio de De Fossard, com 1,8 mg/l de ANA e 0,4 mg/l de AIB. Na ausência de vitamina E, a taxa de enraizamento elevou-se após o 5º subcultivo e com a suplementação de α -tocoferol, aumento do índice de enraizamento no 3º subcultivo e evitando oxidação.

¹ CORMIER, M. Les vitamines E: les tocophérols. In: _____ Les Phytohormones de croissarices; méthodes, chimie, biochimie, physiologie, applications pratique. Paris, Masson, 1961. p.79-110.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Fisiologia de Árvores do Departamento de Ciências Florestais em Piracicaba, SP, no período de Outubro a Dezembro de 1990.

O material foi micropropagado até 18^º subcultivo no laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Melhoramento Genético Florestal da Chamflora Agrícola Ltda, em Mogi-Guaçu, SP, no período de Abril de 1989 a Setembro de 1990.

Os dados referentes aos 30 meses aproximadamente dos subcultivos, origem do material e propagação em "vitro" constam nos itens 4.1.; 4.2.; 4.3. e 4.4..

3.1. Origem das Plantas Matrizes

Os materiais vegetais são originários de híbridos de eucaliptos, procedentes de campos de experimentação da Empresa Chamflora Agrícola Ltda, oriundas da germinação de sementes selecionadas conforme mostram os Quadros 1 e 2.

3.2. Propagação das Estacas

Ramos de aproximadamente, um a dois metros de comprimento coletadas da rebrota das árvores, foram, imediatamente, colocados em caixas de isopor e levados para o viveiro de onde ocorreu o desfolhamento, desinfestação com solução de Benlate 0,5 g/l.

Estacas com 10 cm aproximadamente e um par de folhas foram estabelecidas e levadas para casa de vegetação por um período de 2 meses. Até o surgimento das primeiras brotações, foram realizadas semanalmente pulverizações com Benlate 0,5 g/l e solução nutritiva.

Após esse período, as plantas foram levadas para casa de sombra em vasos com capacidade de vinte litros. O substrato utilizado foi de 50% de mistura de terra de substrato, adicionando 1/3 de palha de arroz, 1/3 de palha carbonizada e 1/3 de terra de sub solo de viveiro. Adubação para plantio foi de 100 g de 10:20:10 de NPK/vaso, por um período de seis meses aproximadamente.

3.3. Propagação do Material "in vitro"

Brotações epicórmicas, oriundas de estacas com aproximadamente 5 cm de comprimento foram submetidas sob agitação à solução de Benlate 0,5g/l⁻¹. Em ambiente asséptico o material foi submerso, em agitação, durante cinco minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% e cinco lavagens

em água destilada e esterelizada.

Segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de comprimento foram inoculados sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar.

Quadro 1. Descrição de árvores matrizes utilizadas no experimento.

Nº CLONE	NOME DO CLONE	ESPÉCIE	LOCAL DE PLANTIO	INTENSIDADE DE SELEÇÃO	DATA PLANTIO	DATA CORTE
01 005 002	(H1)	{ <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Horto de Mogi-Guaçu	1:2500	09/86	03/88
02 005 003	(H2)	{ <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Horto de Mogi-Guaçu	1:2500	09/86	03/88
01 005 004	(H3)	{ <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Horto de Mogi-Guaçu	1:2500	09/86	03/88
07 148 001	(H7)	{ <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Horto de Mogi-Guaçu	1:4200	09/86	03/88
07 148 017	(H8)	{ <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Horto de Mogi-Guaçu	1:4200	09/86	03/88
07 148 018	(H9)	{ <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Horto de Mogi-Guaçu	1:4200	09/86	03/88

Quadro 2. Características silviculturais das árvores matrizes e respectivos tipo de solos e clima.

NOME DO CLONE	TIPO DE SOLO	TIPO DE CLIMA	CARACTERÍSTICAS SILVICULTURAIS	
			DAP	ALTURA (m)
(CH1)	LVA ⁽¹⁾	CWA ⁽²⁾	16,0*	12,5*
(CH2)	LVA ⁽¹⁾	CWA ⁽²⁾	15,5*	20,5*
(CH3)	LVA ⁽¹⁾	CWA ⁽²⁾	20,5*	14,0*
(CH7)	AQ ⁽¹⁾	CWA ⁽²⁾	15,0**	11,5**
(CH8)	AQ ⁽¹⁾	CWA ⁽²⁾	15,5**	11,5**
(CH9)	AQ ⁽¹⁾	CWA ⁽²⁾	15,0**	11,5**

(2) classificação climática pelo sistema de Koeppen

(1) LVA = Latossolo Vermelho Amarelo; AQ = Areias Quartzozas

* Idade 30 meses

** Idade 24 meses

DAP = diâmetro à altura do peito

3.4. Meio de Cultura e Condições Ambientais

O meio de cultura utilizado durante o período precedente ao ensaio (30 meses) foi de GONÇALVES (1980), modificado - MG2, apresentado no Anexo 1. As culturas-estoques foram mantidas em temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1$ sob fotoperíodo de 16 horas/luz.

3.5. Propagação de Explantes após 18^a Subcultivo

Explantes constituídos de tufo de dez brotações em média de 1,0 cm de comprimento de seis diferentes clones foram adotados como padrão em todos os experimentos.

O meio de cultura MG2 foi utilizado como meio básico (Mb), sofrendo modificações de acordo com cada ensaio. Foi acrescentado ao (Mb) solução de própolis a 80% (2 gotas) como fungicida e bactericida; ácido ascórbico (1,76 mg/l) e 2 mg/l de α -tocoferol [vitamina E] mg/l) como agentes anti-oxidantes.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para $6,3 \pm 0,3$ utilizando-se NaOH ou HCl 0,1 N, antes da adição do agar. A homogeneização do meio foi obtida através de aquecimento em chapa elétrica à temperatura constante. No ponto de homogeneização o meio foi dispensado na quantidade de 35 ml/vidro e coberto com tampa de polipropileno.

Autoclavagem para os meios de cultura, foi à temperatura de 121°C e à pressão de $1,05 \text{ kg/cm}^2$, durante 20 minutos.

As etapas de inoculação e subcultivo dos explantes foram conduzidas em câmara de fluxo laminar, utilizados material esterilizado de papel toalha, vidraria, pinça e bisturi.

A temperatura da sala de cultura foi mantida em $27^{\circ}\text{C} \pm 3$ com um fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro. A iluminância foi de 5000 lux, sendo que 4000 lux de lâmpadas luz do dia de 40W cada, num percentual de 5% de incidência vermelho e 28% azul; 1000 lux de lâmpada com incidência de 40% vermelho e 28% azul.

As soluções-estoque dos micro e macronutrientes e vitaminas, componentes do meio básico (Mb) foram preparadas, aumentando em 100 vezes a concentração desses elementos e armazenados em frasco ambar em geladeira a 4°C.

A preparação das soluções-estoque dos reguladores de crescimento foram elaboradas, utilizando-se solvente para citocininas, uma solução de HCl a 1,0 N e, para auxina, uma solução de NaOH a 1,0 N e armazenada em freezer a - 4°C.

Para a preparação das soluções dos esteróides (Progesterona e β -estradiol), a metodologia foi submetida aos seguintes critérios:

- Medicamento Microdiol em comprimidos contendo Progesterona e β -estradiol, foram macerados em graal, durante 30 minutos e a solução agitada por uma hora.

Testes preliminares mostraram que os solventes de compostos lipossolúveis, como acetona, álcool, éter, causam sérios problemas no sistema de fotorespiração, deixando as plantas, em curto período, amarelecidas. Aumentam a permeabilidade das membranas celulares nos tecidos das plantas, além de afetar a sobrevivência das mesmas. Este método de maceração intensiva e dissolução em água destilada, evita esses problemas.

3.6. Experimentos Realizados

3.6.1. Ensaio I - Influência de Diferentes Concentrações de Esteróides e Associação com AIA no Alongamento e Enraizamento das Brotações

Quadro 3. Descrição dos tratamentos e suplementações utilizadas no ensaio I e a composição de cada meio.

TRATAMENTOS HORMONAIIS	COMPOSIÇÃO DO MEIO CULTURA
T0	Meio básico (Mb) (testemunha)
T1	Mb + (progesterona e estradiol)*
T3	Mb + (progesterona e estradiol)* + AIA**

* 5 concentrações (μM) 0,0; 0,0921; 0,1535; 0,2302 e 0,3070.

** concentração 0,1 mg/l.

3.6.2. Ensaio II - Influência de Diferentes Concentrações de Esteróides e Associação com 6-BAP e AIA + 6-BAP na Indução de Brotações

Quadro 4. Descrição dos tratamentos e suplementações utilizadas no Ensaio II e a composição de cada meio.

TRATAMENTOS HORMONAIIS		COMPOSIÇÃO DO MEIO CULTURA
T0	Meio básico (Mb) (testemunha)	
T2	Mb + (progesterona e estradiol)*	BAP**
T4	Mb + (progesterona e estradiol)*	+ [BAP + AIA]***

* 5 concentrações (μM) 0,0; 0,0921; 0,1535; 0,2302 e 0,3070.

** concentração 0,1 mg/l.

*** ambos com 0,1 mg/l cada.

3.7. Análises Estatísticas dos Dados para Ensaio I e II

O delineamento estatístico utilizado nos ensaios I e II foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, empregando seis clones, três tratamentos hormonais, cinco concentrações de esteróides e três repetições sendo cinco brotações por frasco. Os dados de sobrevivência foram transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$, número de brotações e de raízes em $\sqrt{x + 0,5}$, e matéria seca e fresca em $\log(x + 1)$. Para a comparação de médias dos tratamentos utilizou-se o teste de Tukey.

Os dados dos ensaios I e II foram analisados ao nível de médias para porcentagem de sobrevivência, número e altura das brotações, número e comprimento das raízes, produção de matéria fresca e seca da parte aérea das brotações e das raízes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados do Ensaio I - Efeito da Interação Esteróide e Associação com AIA, no Alongamento e Enraizamento das Brotações

Os resultados da porcentagem de sobrevivência, número e altura de brotações, matéria seca (MSPA) e fresca (MFPA) da parte aérea, número e comprimento de raízes, matéria seca (MSR) e fresca (MFR) de raízes, para os diferentes clones, tratamentos hormonais e concentrações de esteróides testadas, são apresentados nas Tabelas 1 a 3.

Tabela 1. Resultados aos 30 dias das análises de variância e do teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para os diferentes clones no Ensaio I (T0, T1 e T3).

CLONES	PORCENTAGEM ¹ SOBREV. (%)	Nº ² BROT.	ALTURA BROT. (cm)	MFPA ³ (mg)	MSPA ³ (mg)
H1	87,6	20,53ab	3,19ab	996,9b	263,7ab
H2	90,0	15,92b	2,80c	715,1b	181,6b
H3	84,6	19,61ab	2,89bc	1002,2b	219,7ab
H7	92,0	24,36a	3,62a	1488,9a	239,5ab
H8	89,9	22,72ab	3,60a	1542,2a	218,9ab
H9	89,3	22,90ab	2,96bc	1436,1a	288,8a
Média Geral	88,9	21,17	3,16	1215,8	233,3
CV (%) exper.	23,5	53,2	25,0	61,1	80,2
F	0,53 ^{ns}	2,33 ^{**}	11,30 ^{**}	9,15 ^{**}	4,32 ^{**}

CLONES	Nº TOTAL ² RAÍZES	COMPRIM. RAÍZES (cm)	MFR ³ (mg)	MSR ³ (mg)
H1	2,77ab	3,31ab	92,6ab	26,4ab
H2	1,19c	1,47c	20,9c	6,0b
H3	2,19bc	2,58bc	59,3b	11,1b
H7	2,97ab	5,00a	159,2a	16,6ab
H8	4,00a	4,28ab	131,2ab	37,2a
H9	2,83ab	3,37ab	119,1ab	21,1ab
Média Geral	2,87	3,39	99,7	20,0
CV (%) exper.	70,45	79,3	125,8	162,0
F	6,67 ^{**}	8,01 ^{**}	9,88 ^{**}	8,75 ^{**}

ns = não significativo; * = significativo a 5% pelo teste F

** = significativo a 1% pelo teste F

Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukley ao nível 5%

1 Dados transformados em arc sen $\sqrt{x/100}$; 2 Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$; 3 Dados transformados em log (x+1)

MFDA= matéria fresca da parte aérea; MSPA= matéria seca da parte aérea; MFR= matéria fresca das raízes e MSR= matéria seca das raízes.

4.1.1. Resultados para diferentes clones (H1 - H2 - H3 - H7 - H8 e H9)

As análises de variância dos dados médios mostradas na Tabela 3, evidenciaram diferenças altamente significativas ($\alpha = 1\%$) entre os clones para número e altura das brotações, MFPA e MSPA, número e comprimento de raízes, MFR e MSR, enquanto que para a porcentagem de sobrevivência não foram detectadas diferenças. Considerando que a média geral para sobrevivência foi de aproximadamente 90%, as diferenças não detectadas entre clones podem ser atribuídas à erro experimental, devido à variações fisiológicas inerentes à planta ou manipulações da técnica. Esses mesmos resultados, para modelo de sobrevivência, quando observados aos resultados de DAS & MITRA (1990) citados na literatura, parecem não confirmar que a propagação de *E. tereticornis* Smith, tenha respondido diferentemente porque eram originários de locais diferentes. Para os híbridos de *Eucalyptus* micropropagados, neste estudo, os clones H1, H2 e H3 são procedentes de latossolo vermelho amarelo e H7, H8 e H9 de areias quartzozas. Embora oriundos de diferentes regiões, a porcentagem de sobrevivência não se alterou estatisticamente.

Figura 1. Porcentagem de sobrevivência entre os diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.

A habituação dos clones ao mesmo meio de cultura, aos quais foram submetidos por um longo período, poderia responder rapidamente e melhor, quando submetidos a um novo meio.

Ainda na Tabela 1, o teste Tukey para comparação entre médias mostrou diferenças estatísticas entre os clones H7, H8 e H9 para todas as variáveis estudadas, demonstrando serem os melhores materiais genéticos avaliados, com valores superiores a média dos dados, evidenciando

potencial para a propagação "in vitro". Estes dados podem ser confirmados nas Figuras 3, 4, 6 e 7, dos histogramas mostrados.

4.1.2: Resultados para diferentes tratamentos hormonais (T0 - T1 e T3)

Na Tabela 2, os resultados das análises de variância revelam diferenças altamente significativas ($\alpha = 1\%$) para número de brotações, MFPA; número, comprimento, MFR e MSR de raízes. Houve efeito significativo ($\alpha = 5\%$) entre os tratamentos hormonais para porcentagem de sobrevivência, MSPA, enquanto que para altura das brotações a interação entre os tratamentos hormonais não foi a melhor.

Tabela 2. Resultados aos 30 dias das análises de variância e do teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para os diferentes tratamentos hormonais no Ensaio I (T0, T1 e T3).

TRAT. HORMONAL	PORCENTAGEM ¹ SOBREV. (%)	Nº ² BROT.	ALTURA BROT. (cm)	MFPA ³ (mg)	MSPA ³ (mg)
T0	100,0a	32,67a	3,02	1727,3a	162,5b
T1	88,2ab	22,25b	3,26	1333,2b	263,1a
T3	86,9b	17,20c	3,08	967,5c	219,9ab
média	88,9	21,17	3,16	1215,8	233,3
CV (%)	23,5	53,2	25,0	61,1	80,2
F	4,30*	20,07**	1,81 ^{ns}	19,46**	4,31*

TRAT. HORMONAL	Nº TOTAL ² RAÍZES	COMPRIM. RAÍZES (cm)	MFR ³ (mg)	MSR ³ (mg)
T0	1,67b	2,85a	17,7c	2,2b
T1	2,20b	2,87a	91,8b	24,0a
T3	3,48a	4,05a	128,1a	20,2a
média	2,69	3,39	99,7	20,0
F	82,6	79,37	125,8	162,0
CV (%)	14,80**	5,18**	18,65**	4,51**

ns = não significativo

* = significativo a 5% pelo teste F

** = significativo a 1% pelo teste F

Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukley ao nível 5%

1 Dados transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$

2 Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$

3 Dados transformados em $\log(x+1)$

MFDA = matéria fresca da parte aérea

MSPA = matéria seca da parte aérea;

MFR = matéria fresca das raízes

MSR = matéria seca das raízes.

A comparação entre médias pelo teste Tukey, mostrou superioridade da testemunha T0 (meio básico) com uma porcentagem de sobrevivência de 100%, para as brotações. Além das causas já apontadas, outras poderiam justificar o sucesso da testemunha. Uma delas é que as culturas anteriormente mantidas durante vários subcultivos em um único meio de cultura, poderiam estar "carregando" uma sobrecarga hormonal, expressando melhor sua capacidade em um novo meio de cultura, evidenciando um efeito residual.

Entre outros resultados obtidos com os diferentes tratamentos hormonais, a interação dos esteróides com auxina no Ensaio I, não apenas promoveu diferenças no tipo de raiz, como também na plasticidade das brotações, mostrando um aspecto mais característico, não vitrificados das folhas e caule, harmonizando com a arquitetura da nova planta. Se há evidências de que os esteróides possam afetar a permeabilidade das membranas, é possível que esta seja diminuída permitindo adequar a planta a muitos outros determinantes fisiológicos do crescimento e consequentemente da produtividade das mesmas.

Houve diferenças altamente significativas comparadas entre os tratamentos hormonais de T1 (mb + esteróides) e T3 (mb + esteróide + AIA). Tratamento T1 foi superior para número, altura, MFPA e MSPA, das brotações, enquanto T3 mostrou que é mais eficiente para a fase de enraizamento, comprimento e MFR das raízes.

Figura 2. Número médio de brotações dos diferentes clones em função das diferentes concentrações de esteróides no Ensaio I.

Figura 3. Altura média das brotações (cm) dos diferentes clones, face as concentrações de esteróides no Ensaio I.

A associação entre meio básico e esteróide do tratamento T1, favoreceu um maior número de brotações, muito embora os valores de médias para altura das mesmas para os tratamentos T0 e T3 permaneceram muito próximos. Conforme postulado na literatura, KUIPER & KUIPER (1978) os conteúdos de esteróides podem controlar os mecanismos de transporte de nutrientes através das raízes, o que parece evidenciar os resultados obtidos.

Figura 4. Produção de matéria fresca da parte aérea das brotações - MFPA - (mg) dos diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.

Figura 5. Produção de matéria seca da parte aérea das brotações - MSPA - (mg) dos diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.

Figura 6. Número médio de raízes das brotações dos diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.

4.1.3. Resultados de diferentes concentrações hormonais (0 - 1 - 2 - 3 e 4)

A Tabela 3, apresenta os resultados das análises de variância e do teste Tukey ($\alpha = 5\%$) para as diferentes concentrações de esteróides em associação com AIA.

Tabela 3. Resultados aos 30 dias das análises de variância e do teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para diferentes concentrações de esteróides no Ensaio I (T0, T1 e T3).

CONC.	PORCENTAGEM ¹ SOBREV. (%)	Nº ² BROT.	ALTURA BROT. (cm)	MFPA ³ (mg)	MSPA ³ (mg)
0	90,3	22,12	3,06	1245,4	269,3a
1	91,0	17,84	3,15	1098,4	276,7a
2	92,0	24,56	3,16	1440,9	208,1ab
3	84,3	19,33	3,28	984,9	252,0ab
4	83,2	19,32	3,16	1130,9	161,3b
média geral	88,9	21,17	3,16	1215,8	233,3
CV (%)	23,5	53,2	25,0	61,1	80,2
F	0,92 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,49 ^{ns}	1,90 ^{ns}	3,25 [*]

CONC.	Nº TOTAL ² RAÍZES	COMPRIM. RAÍZES (cm)	MFR ³ (mg)	MSR ³ (mg)
0	3,00	3,39a	140,7a	24,2ab
1	3,10	3,92a	132,0a	28,0a
2	2,30	3,39	68,8b	14,1b
3	2,64	3,70	89,0ab	23,7ab
4	2,64	2,39a	79,2b	12,3b
média geral	2,69	3,39	99,7	20,0
CV (%)	82,8	79,3	125,8	162,0
F	0,90 ^{ns}	2,54 [*]	4,20 ^{**}	3,15 [*]

ns = não significativo

* = significativo a 5% pelo teste F

** = significativo a 1% pelo teste F

Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukley ao nível 5%

1 Dados transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$

2 Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$

3 Dados transformados em $\log(x+1)$

MFDA = matéria fresca da parte aérea

MSPA = matéria seca da parte aérea;

MFR = matéria fresca das raízes

MSR = matéria seca das raízes.

Na Tabela 3, não foram reveladas diferenças significativas entre as variáveis analisadas, com exceção para comprimento, MFR e MSR das raízes e MSPA.

Os dados mostram ainda, que embora as médias entre as concentrações, não tenham diferido estatisticamente de uma concentração para outra, dose representa uma variável qualitativa. Outra razão, está na proximidade dos níveis de esteróides utilizados entre tratamentos testados. Sugere-se a necessidade de que possam avaliar uma faixa mais ampla entre as concentrações testadas, e aplicação de outros modelos de análise de regressão.

Para comparação de médias das diferentes concentrações de esteróides, o teste Tukey revelou que a concentração 4 (0,3070 μM de esteróides) foi comparativamente a de menor expressão para todos os resultados apresentados na Tabela 3.

Figura 7. Comprimento médio das raízes (cm) oriundas das brotações de diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.

4.1.4. Resultados das interações: clone x hormônio; clone x concentração e hormônio x concentra- ção

A Tabela 4 mostra os resultados da análise de variância para as interações clone x hormônio; clone x concentração e hormônio x concentração.

Tabela 4. Resultados aos 30 dias das análises de variância para as interações entre clone, tratamento hormonal e concentração no Ensaio I (T0, T1 e T3).

INTERAÇÕES	PORCENTAGEM ¹ SOBREV. (%)	Nº ² BROT.	ALTURA BROT. (cm)	MFPA ³ (mg)	MSPA ³ (mg)
Clone x Horm.	0,45 ^{ns}	3,15 [*]	3,64 ^{**}	4,34 ^{**}	8,36 ^{**}
Clone x Conc.	0,51 ^{ns}	1,41 ^{ns}	1,24 ^{ns}	1,83 [*]	2,44 ^{**}
Horm. x Conc.	0,54 ^{ns}	1,34 ^{ns}	2,24 ^{ns}	3,82 [*]	5,47 ^{**}

INTERAÇÕES	Nº TOTAL ² RAÍZES	COMPRIM. RAÍZES (cm)	MFR ³ (mg)	MSR ³ (mg)
Clone x Horm.	1,20 ^{ns}	1,83 [*]	7,92 ^{**}	4,58 ^{**}
Clone x Conc.	1,70 [*]	1,03 ^{ns}	1,78 [*]	1,42 ^{ns}
Horm. x Conc.	3,08 [*]	0,97 ^{ns}	1,29 ^{ns}	1,31 ^{ns}

ns = não significativo

* = significativo a 5% pelo teste F

** = significativo a 1% pelo teste F

Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukley ao nível 5%

1 Dados transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$

2 Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$

3 Dados transformados em $\log(x+1)$

MFDA = matéria fresca da parte aérea

MSPA = matéria seca da parte aérea;

MFR = matéria fresca das raízes

MSR = matéria seca das raízes.

Para os dados médios entre clones x hormônio, houve efeito altamente significativo para altura, MFPA

e MSPA das brotações; MFR e MSR das raízes. Efeito significativo a nível de ($\alpha = 5\%$) para número de brotações e comprimento de raízes.

A interação clone x concentração foi apenas significativa para a MFPA das brotações e MFR das raízes; altamente significativa para MSPA.

A interação hormônio x concentração foi altamente significativa para MSPA; significativa a nível de 5% para número de raízes e MFPA.

É interessante observar que dentre as três interações a porcentagem de sobrevivência não foi significativa, reforçando as observações já consideradas e os dados dos resultados de sobrevivência isolados. O que demonstra, mais uma vez, neste exemplo que os clones, especialmente H7, H8 e H9 se mostraram potencialmente mais adequados para serem propagados.

A associação esteróide e AIA para variável altura de brotações, parece estar de acordo com observações da literatura onde o significado fisiológico da ação dos esteróides em plantas, estão voltados para respostas no alongamento e crescimento, (LÖVE & LÖVE (1945).

Dados já citados por CARVALHO (1988), demonstraram que para se obter um bom alongamento em culturas de *E. grandis* *in vitro* foi necessário uma baixa concentração de auxina (0,01 mg/l) na presença de giberelina (1 mg/l), durante sucessivos cultivos. As taxas de multiplicação foram

influenciadas pelos números de brotações viáveis, a presença de hormônios e a eficiência técnica.

Figura 8. Produção média de matéria fresca das raízes - MFR - (mg) dos diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.

À essas observações deve-se acrescentar que além da presença de hormônios, outras substâncias, podem ser consideradas pontos importantes para pesquisa na cultura "in vitro" do eucalipto, como a presença de esteróides associado à auxina e/ou citocininas.

Adicionalmente, para o mesmo autor, as altas concentrações de citocininas juntamente com níveis crescentes de auxinas, aumentam o número de brotos de *E. grandis* prejudicando o crescimento individual da planta. No entanto, neste trabalho, a ação sinérgica de 0,1 mg/l de AIA e as diferentes concentrações de esteróides mostraram efeitos benéficos tanto na produção de brotações como no alongamento individual e no número de raízes. Resultados similares foram obtidos por KELMKAMP & BONER (1953) onde estrone, um esterol vegetal que em concentração de 1 mg/l promoveu acentuada atividade na taxa de crescimento de embriões excisados de ervilha, com 20% mais que o controle.

Figura 9. Produção média de matéria seca das raízes - MSR - (mg) dos diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio I.

4.2. Resultados do Ensaio II - Efeito da Interação Esteróide em Associação com 6-BAP e 6-BAP + AIA

Os resultados da porcentagem de sobrevivência, número e altura das brotações, matéria seca (MSPA) e fresca (MFPA) da parte aérea, para os diferentes clones, tratamentos hormonais e concentrações de esteróides testadas, são apresentadas nas Tabelas, 5, 6, 7 e 8.

Tabela 5. Resultados aos 30 dias das análises de variância e do teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para os diferentes clones no Ensaio II (T0, T2 e T4).

CLONES	PORCENTAGEM ¹ SOBREV. (%)	Nº ² BROT.	ALTURA BROT. (cm)	MFPA ³ (mg)	MSPA ³ (mg)
H1	93,3	37,47b	2,64	1779,0abc	250,9bc
H2	90,8	41,00b	2,49	1597,9bc	250,1bc
H3	93,1	51,86ab	2,61	2443,2a	576,1a
H7	90,7	52,25a	2,86	2271,4ab	705,0a
H8	85,5	39,34b	2,57	1576,4c	340,8c
H9	89,6	49,44b	2,93	2273,4ab	500,8ab
Média Geral	90,4	45,79	2,68	1988,2	436,3
CV (%)	20,3	59,5	32,0	47,6	89,3
F	0,68 ^{ns}	4,44 ^{**}	1,13 ^{ns}	6,35 ^{**}	8,72 ^{**}

ns = não significativo

* = significativo a 5% pelo teste F

** = significativo a 1% pelo teste F

Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukley ao nível 5%

1 Dados transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$

2 Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$

3 Dados transformados em $\log(x+1)$

MFDA = matéria fresca da parte aérea

MSPA = matéria seca da parte aérea;

4.2.1. Resultados para os diferentes clones (H1 - H2 - H3 - H7 - H8 e H9)

As análises de variância dos dados de médias mostradas na Tabela 5, evidenciam diferenças altamente significativas entre clones ($\alpha = 1\%$) para número de brotações,

MFPA e MSPA e não significativos para a porcentagem de sobrevivência e altura das brotações. Os resultados dos altos índices de porcentagem de sobrevivência dos clones, descritos no ensaio I, repete-se no ensaio II. A sobrevivência mostrou não ser um parâmetro influenciado diretamente pela origem dos clones, mas sim pela resposta de comportamento das plantas, frente à outras variáveis analisadas e à influência de concentração dos esteróides.

Figura 10. Porcentagem de sobrevivência entre os diferentes clones e concentrações de esteróides no Ensaio II.

Diferenças altamente significativas a nível de $\alpha = 1\%$ para o número médio de brotações por clone alcançaram os objetivos propostos no ensaio II. O clone H7 foi superior aos demais, seguido do H3 e H9 para obtenção das brotações diferindo estatisticamente, pelo teste Tukey a 5% dos clones H8, H1 e H2, o que pode ser observado na Figura 11.

Figura 11. Número médio de brotações dos diferentes clones em função das diferentes concentrações de esteróides no Ensaio II.

Figura 12. Altura média das brotações (cm) dos diferentes clones, face as concentrações de esteróides.

4.2.2. Resultados para os diferentes tratamentos hormonais (T0 - T2 e T4) no Ensaio II

Na Tabela 6, os resultados das análises de variância dos dados médios para tratamentos hormonais (T0, T2 e T4) revelaram diferenças altamente significativas para número de brotações, MFPA, MSPA e diferenças significativas a nível de ($\alpha = 5\%$) para porcentagem de sobrevivência e altura das brotações. Houve diferenças significativas entre os

tratamentos hormonais. A comparação entre as médias pelo teste Tukey ($\alpha = 5\%$), para a variável sobrevivência, mostrou superioridade do tratamento testemunha (T0) que foi diferente de T2 e T4.

Tabela 8. Resultados aos 30 dias das análises de variância e do teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para os diferentes tratamentos hormonais no Ensaio II (T0, T2 e T4).

TRAT. HORMONAL	PORCENTAGEM ¹ SOBREV. (%)	Nº ² BROT.	ALTURA BROT. (cm)	MFPA ³ (mg)	MSPA ³ (mg)
T0	100,0a	32,67b	3,03a	1727,3a	162,6b
T2	90,9ab	62,86a	2,70a	2157,1a	305,6a
T4	87,8b	33,98b	2,57a	1899,2a	612,3a
média	1,40	8,50	2,68	1988,2	436,3
CV (%)	21,3	29,3	32,0	47,6	89,3
F	3,27*	37,96**	2,21*	3,35**	11,6**

ns = não significativo

* = significativo a 5% pelo teste F

** = significativo a 1% pelo teste F

Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukley ao nível 5%

1 Dados transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$

2 Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$

3 Dados transformados em $\log(x+1)$

MFPA = matéria fresca da parte aérea

MSPA = matéria seca da parte aérea;

Diferenças altamente significativas dos tratamentos, em relação ao número médio de brotações para o tratamento T2 (mb + esteróide + BAP), demonstraram que pode ter

ocorrido um sinergismo entre esteróides e citocininas. A nível significativo de 5% pelo teste Tukey, a porcentagem de sobrevivência para o tratamento T0 não diferiu do tratamento T4. Para altura média das brotações foram significativas as diferentes combinações de esteróides e citocininas e/ou esteróides e auxinas, evidenciados nos tratamentos T2 e T4. Para a produção de matéria fresca (MSPA) e seca (MSPA) da parte aérea o melhor tratamento foi T2 e a testemunha pouco efetiva.

Figura 13. Produção de matéria fresca da parte aérea das brotações - MSPA - (mg) dos diferentes clones e concentrações de esteróides.

Figura 14. Produção de matéria seca da parte aérea das brotações - MSPA - (mg) dos diferentes clones e concentrações de esteróides.

Os resultados deste ensaio para obtenção de um número máximo de brotações, através da ação sinérgica dos esteróides com auxina e citocinina, mostraram-se promissores. Se o "balanço hormonal" entre citocininas e auxinas for um determinante crítico no estabelecimento do meio de cultura e no processo de organogênese, a ação hormonal associada a outras substâncias, como esteróides, "in vitro", pode ser muito efetiva, no processo da divisão celular,

modulando e controlando a nível nuclear e do citoplasma, a síntese desses compostos.

Isto, também parece estar de acordo com o postulado de LETHAN (1983) onde mecanismo de síntese das citocininas é via tRNA, um processo fundamental e pouco compreendido. As citocininas podem causar aumento na velocidade de síntese de tRNA, rANA e mRNA, agindo a nível de pós transcrição e, são necessárias para manter os níveis de clorofila e proteína durante o ciclo de vida da plântula.

Mediante as considerações dos autores citados, os aspectos de vigor das brotações, ausência de calos e desenvolvimento das plantas, podem induzir a uma possível hipótese: esses aspectos controlados pela ação dos esteróides deram as brotações multiplicadas uma aparência de plântulas rustificadas, facilitando o seccionamento das mesmas quando submetidas a novo subcultivo.

Pode-se admitir que os esteróides (progesterona e estradiol) possuam uma função na pré-determinação e determinação da competência da célula. Dessa forma teria um papel fundamental na vitrificação.

4.2.3. Resultados de diferentes concentrações de esteróides no Ensaio II

Os resultados das análises de variância dos dados das médias, apresentados na Tabela 7 para as diferentes concentrações de esteróides não mostraram diferenças significativas para todas as variáveis analisadas. O teste Tukey revelou que as diferentes concentrações só influenciaram na determinação da altura das brotações e MFPA.

Estando muito próximas as concentrações podem ter exercido um efeito linear, deixando os resultados muito próximos uns dos outros. Houve predomínio da concentração de número 4, que corresponde a 0,2302 μM de esteróides (progesterona + estradiol).

Tabela 7. Resultados aos 30 dias das análises de variância e do teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para diferentes concentrações de es esteróides no Ensaio II (T0, T2 e T4).

CONC.	PORCENTAGEM ¹ SOBREV. (%)	Nº ² BROT.	ALTURA BROT. (cm)	MFPA ³ (mg)	MSPA ³ (mg)
0	92,4	56,69	2,56	2263,9	439,5
1	86,7	48,20	2,87	1978,2	405,5
2	93,2	40,74	2,64	1928,8	388,6
3	90,4	44,96	2,40	1978,6	552,0
4	86,9	44,91	2,95	1853,3	444,6
média geral	90,4	45,79	2,68	1988,2	436,3
CV (%)	20,3	59,5	32,0	47,6	89,3
F	0,51 ^{ns}	1,56 ^{ns}	2,92 [*]	4,56 ^{**}	1,18 ^{ns}

ns = não significativo

* = significativo a 5% pelo teste F

** = significativo a 1% pelo teste F

Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukley ao nível 5%

1 Dados transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$

2 Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$

3 Dados transformados em $\log (x+1)$

MFPA = matéria fresca da parte aérea

MSPA = matéria seca da parte aérea;

Durante o processo de multiplicação por segmentos nodais, torna-se importante conhecer a possível influência do meio das culturas e das concentrações dos reguladores de crescimento. Dados da literatura, mostram que CARVALHO (1988) utilizou concentração de - 0,5 - 1,0 mg.l⁻¹ de BAP em possíveis combinações com ANA, obtendo intensa

multiplicação dos internódios curtos e das gemas de *E. grandis* (tufos).

GUPTA et alii (1980) ao propagar "in vitro" *Tectona grandis* L. considerou importante a inoculação de mais que um broto (três) por tubo de ensaio para intensificar a multiplicação, o que parece estar em desacordo com os resultados obtidos neste trabalho, onde apenas um expante nodal foi suficiente de produzir uma média de 30 a 40 brotações no tratamento T2, em balanço de BAP e esteróide. Torna-se difícil, entretanto, generalizar este fato, tendo em vista que materiais genéticos propagados eram diferentes em suas origens.

4.2.4. Resultados das interações: clone x hormônio; clone x concentração e hormônio x concentra- ção no Ensaio II

A Tabela 8 mostra que os resultados das análises para as combinações fatoriais de clone x hormônio foram significativas a nível de 5% para o número médio de brotações; efeito altamente significativo a nível de 1% para a produção de MSPA.

As interações entre clones x concentração foi significativa apenas para a produção de matéria fresca (MFPA) e número de brotações da parte aérea.

Tabela 8. Resultados aos 30 dias das análises de variância para as interações entre clone, tratamento hormonal e concentração no Ensaio II (T0, T2 e T4).

INTERAÇÕES	PORCENTAGEM ¹ SOBREV. (%)	Nº ² BROT.	ALTURA BROT. (cm)	MFPA ³ (mg)	MSPA ³ (mg)
Clone x Horm.	0,57 ^{ns}	0,81 ^{ns}	0,79 ^{ns}	1,45 ^{ns}	2,07 ^{ns}
Clone x Conc.	0,51 ^{ns}	3,81 ^{**}	0,95 ^{ns}	2,73 ^{**}	1,39 ^{ns}
Horm. x Conc.	0,43 ^{ns}	0,49 ^{ns}	0,67 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,28 ^{ns}

ns = não significativo

* = significativo a 5% pelo teste F

** = significativo a 1% pelo teste F

Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukley ao nível 5%

1 Dados transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$

2 Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$

3 Dados transformados em $\log(x+1)$

MFPA = matéria fresca da parte aérea

MSPA = matéria seca da parte aérea;

Pode-se aferir, por hipótese, que se as concentrações estivessem mais distanciadas ou houvesse uma adequação do período de avaliação as diferenças poderiam ser melhor avaliadas, pois quando se analisa as interações entre hormônio e concentração, a (MFPA) torna-se altamente significativa. Ainda que os níveis de concentrações, sejam muito próximos, a indução de brotações foram altamente promissoras, o que torna na prática, o método aplicável.

4.3. Discussões Finais

A análise dos resultados obtidos permitiram concluir que:

4.3.1. Ensaio I

Variações genéticas, origens e habituação dos clones foram detectados na interação de progesterona + estradiol associados com AIA. Os efeitos foram altamente significativos para as variáveis de número, altura média, produção de matéria fresca (MFPA) e seca (MRPA) para brotações, obtenção de raízes, comprimento, matéria fresca (MFR) e seca (MSR) de raízes; com exceção apenas para porcentagem de sobrevivência, não significativos, sendo a habituação dos clones, um dos indicativos deste resultado.

Os tratamentos hormonais pelas análises demonstraram que a interação entre progesterona + estradiol com AIA apontaram efeitos altamente significativos para o número de brotações, MFPA, número de raízes, comprimento, MFR e MSR. Valores significativos ($\alpha = 5\%$) para sobrevivência e MSPA, sendo T3 (mb + AIA + esteróides) o melhor tratamento para obtenção de raízes e T1 (mb + esteróides) para o número de brotações.

Os resultados de concentrações das análises de interação de esteróides (P+E) e AIA, demonstraram um resultado linear, não significativo para porcentagem de sobrevi-

vência, número, altura, MSPA das brotações. A justificativa desses resultados pode ser indicativo dos níveis muito próximos das concentrações, o que sugere testes e análises de uma faixa mais ampla das concentrações.

Diferenças significativas foram obtidas para MSPA, comprimento de raízes, MFR e MSR.

A interação de auxina e esteróides promoveu diferenças no tipo raiz, evidenciando uma plasticidade à nova planta. O tratamento T0, mostrou superioridade da testemunha para porcentagem de sobrevivência.

A interação entre clone x hormônio mostrou-se significativa para MSPA para as brotações; entre clone x concentração foram significativas ($\alpha = 1\%$) para MFPA, e, significativo a nível de 5% para número de brotações. A interação entre hormônio x concentração não foram significativas para todas as variáveis.

4.3.2. Ensaio II

Variações genéticas, origens e habituação foram detectadas entre os clones na interação progesterona com estradiol associado a 6-BAP. Os clones H7, H3 e H9 mostraram-se potenciais para a indução de brotações.

Os resultados dos tratamentos hormonais mostraram diferenças altamente significativas para o número de brotações sendo T2 (mb + esteróides + 6-BAP) mais eficaz que T4 (mb + esteróides + 6-BAP e AIA). As diferenças foram

significativas a nível de ($\alpha = 5\%$) para altura e porcentagem de sobrevivência e altamente significativas a nível de ($\alpha = 1\%$) para número de brotações, MFPA e MSPA.

As análises dos resultados para as diferentes concentrações mostraram-se diferenças significativas para altura das brotações. Para o número médio de brotações e MSPA e porcentagem de sobrevivência não houve diferenças; uma das causas apontadas seria a proximidade dos níveis das concentrações.

As interações clone x hormônio; clone x concentração e hormônio x concentração, da Tabela 8, mostraram-se efeitos altamente significativas para o número médio de brotações, MSPA, MFPA, indicando que houve efeito sinérgico entre os esteróides e suas combinações com AIA, B-BAP ou ambas.

As interações clone x hormônio e hormônio x concentração da Tabela 8 indicaram que não houve efeitos significativos para nenhuma das variáveis analisadas; para clone x concentração a produção de matéria fresca da parte aérea foi altamente significativa ($\alpha = 1\%$), bem como para o número médio de brotações. Atribuiu-se a esses resultados uma consequência da proximidade das concentrações às variáveis analisadas.

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiram as seguintes conclusões:

1. A interação de progesterona e estradiol na presença de AIA, evidenciou efeitos altamente significativos no alongamento e enraizamento dos clones;
2. A interação de progesterona e estradiol com 8-BAP, mostrou efeitos altamente significativos na indução de brotações dos clones;
3. O uso de esteróides progesterona e estradiol em associação com AIA, 8-BAP ou AIA + 8-BAP, permitiu a obtenção de plântulas rustificadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONI, R. & JACOBS, W.P. The time course of sieve tube vessel regeneration and their relation to phloem anastomoses in nature internodes of coleus. *American Journal of Botany*, Columbus, 64: 615-21, 1977.
- ALONI, R. & SACHS, T. The three dimensional structure of primary phloem systems. *Planta*, Heidelberg, 113: 345-53, 1973.
- ANEJA, S. & ATAL, C.K. Planted formation in tissue cultures from lignotubers of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Current Science*, Bangalore, 39: 69, 1969.
- AUNG, L.H. & STEFFENS, G.L. Thia diazuron and bud formation and growth responses of lycopersicon seedling. *Phyton*, Buenos Aires, 51(2): 153-8, 1990.
- BALKE, N.E. & HODGES, T.K. Inhibition of the plasma membrane. ATPase by phenolics. *Plant Physiology*, Bethesda, 56 (supl. 41): 319-25, 1975.
- BALKE, N.E. & HODGES, T.K. Effects of diethylstilbestrol on ion fluxes in oat roots. *Plant Phynology*, Bethesda, 63: 42-7, 1979.
- BENNET, I.J. & MacCOMB, J.A. Propagation of jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. *Australian Forest Research*, East Melbourne, 12: 121-7, 1982.

- BURROWS, W.J. & CAR, D.J. Effects of flooding the roots system of sunflower plants on the cytokinin content in the xilema sap. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, 22: 1105-12, 1969.
- CARVALHO, D. de. Micropropagação de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden através da cultura in vitro de segmentos nodais. Lavras, 1988. 79p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura de Lavras).
- CHEN, E.M. & HALL, R.H. Biosynthesis of $N^2 - \Delta^2$ - isopentenyl adenosine in the transfer ribonucleic acid of cultured tobacco pith tissue. *Phytochemistry*, Oxford, 8: 1887-95, 1969.
- CLELAND, R.E. Cell wall extension. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 22: 197-222, 1971.
- CLELAND, R.E. Wall extensibility; hormones and wall extension. In: TANNER, W. & LOEWUS, F.A., ed. *Plant carbohydrates*. Heidelberg, Springer Verlag, 1981. v.2: Extracellular Carbohydrates, p.255-73. (Encyclopedia Plant Physiology, 13B).
- CLELAND, R.E. The capacity for acid - induced wall loosening as a factor in the control of *Avena coleoptile* cell elongation. *Journal of Experimental Botany*, San Francisco, 34: 676-80, 1983.
- DAS, T. & MITRA, G.C. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 22: 95-103, 1990.
- DEFAGO, G.; CHILD, J.J.; HASKINS, R.H. Induction of oogenesis by polyene antibiotics and interaction with cholesterol in a *Pythium* species PRL 4142. *Canadian Journal of*

Microbiology, Ottawa, 15: 509-14, 1969.

DE FOSSARD, R.A. Tissue culture of *Eucalyptus*. Australian Forestry, Canberra, 37: 43-54, 1974.

DE FOSSARD, R.A. Tissue culture in horticulture. A perspective. Acta Horticulturae, Wageningen, 78: 455-9, 1977.

ELMORE, H.W.; SAMPLES, B.; SHARMA, B.; HARRISON, M. Influence of cultural and physiochemical factors on ascorbate stability in plant tissue culture media. Plant Cell Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 20: 131-5, 1990.

FIESER, L.F. & FIESER, M. Steroids. New York, Reinhold, 1958. 945p.

FURZE, M.J. & CRESWELL, C.F. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* and *nitens* using tissue culture techniques. South African Forestry Journal, Pretoria, 135: 20-3, 1985.

GONÇALVES, A.N. Reversão à juvenilidade e clonagem de *E. urophylla* S.T. Blake. Piracicaba, 1982. 97p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

GOODWIN, P.B. & MORRIS, S.C. Application of phytohormones to Pea roots after removal of the apex: Effect on lateral production. Australian Journal of Plant Physiology, East Melbourne, 6: 195-200, 1979.

GRUNWALD, C. Effect of sterols on the permeability of alcohol - treated red beef tissue. Plant Physiology, Bethesda, 43: 484-8, 1968.

- GRUNWALD, G. Plant sterol. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 28: 209-36, 1976.
- GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees - clonal propagation of mature trees of *E. citriodora* Hook by tissue culture. *Plant Science Letters*, Limerick, 20(3): 195-201, 1980.
- HEFFMANN, E. Biochemistry of plant steroids. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 14: 225-48, 1963.
- HEWITT, E.W. & WAREING, P.F. Cytokinin in *Populus x robusta*: changes during chilling and bud burst. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 28: 393-9, 1973.
- HOUSLAY, M.D. & STANLEY, K.K. *Dynamics of biological membranes*, New York, John Wiley, 1990.
- JACOBS, M. & GILBERT, S.F. Basal localization of the presumptive auxin transport carrier in pea stem cells. *Science*, Washington, 220: 1297-300, 1983.
- JACQUIOT, C. Application de la technique des tissus végétaux à l'étude de quelques problèmes de la physiologie de l'arbre *Annales des Sciences forestales*, Paris, 21: 311, 1964.
- KELMKAMP, G. & BONNER, J. Some relationships of sterols to plant growth California. *Plant Physiology*, Bethesda, 28: 428-36, 1953.
- KITAHARA, E.H. & CALDAS, L.S. Shoot and root formation in hypocotyl callus cultures of *Eucalyptus*. *Forest Science*, Bethesda, 22: 242-3, 1975.

- KODA, Y. & OKAZAWA, Y. Cytokinin production by tomato root: occurrence of cytokinins in staled medium of root culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 44: 412-6, 1978.
- KOPCEWICZ, J. Estrogens in developing bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Phytochemistry*, Oxford, 10: 1423-7, 1971a.
- KOPCEWICZ, J. Influence of steroidal hormones on flower sex expression in *Ecballium elaterium*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 65: 92-4, 1971b.
- KOPCEWICZ, J. Strogens in the long-day plants *Hyoscejamus* night and *salvia splendens* grown under inductive and non-inductive light conditions. *New Phytologist*, Cambridge, 71: 129-34, 1972a.
- KOPCEWICZ, J. Strogens in the short day plants *Perilla ocimoides* and *chenopodium rubrum* under inductive and non-inductive light conditions. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 67: 373-6, 1972b.
- KOPCEWICZ, J. Influence of shone on growth and endogenous gibberellins content in dwarf pea. *Bulletion de l'Academie Polonaise des Sciences*, Ser. Sciences Biologiques, Warsaw, 17: 727-31, 1973.
- KUIPER, D. & KUIPER, J. Lipid composition on the roots of Plantage Species Response to alterations of the level of mineral nutrition and ecological significance. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 49: 81-6, 1978.
- LAW, D.M. & HAMILTON, R.H. Mechanism of GA - enhanced IAA biosynthesis. *Plant Physiology*, Bethesda, 77(5): 2, 1985.

- LEHNINGER, A.L. Vitaminas e Microelementos na função das Enzimas, cap.9. In: _____. Princípios de bioquímica. São Paulo, Sarvier, 1985. p.198.
- LESHEN, Y. Physiological effects of animal steroid and gonadotropic hormones on curd cuttings of *Brassica oleracead*. *Phyton*, Buenos Aires, 24: 25-9, 1967.
- LETHAN, D.S. & PALNI, L.M.S. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 34: 163-97, 1983.
- LÖVE, A. & LÖVE, D. Experiments on the effects of animal sex hormones on dioecious plants. *Arkiv for Botanik*, Stockholm, 32A(13): 1-60, 1945.
- MARCAVILLACA, M.C. & MONTALDI, E.R. Cultivo "in vitro" de tecidos de eucalipto. *IDIA*, Buenos Aires, 12: 62-4, 1964.
- McDAVID, C.R.; SAGAR, C.R.; MARSHALL, C. The effect of auxin from the shoot on root development in *Pisum sativum*. *New Phytologist*, Cambridge, 71: 1027-32, 1972.
- MORRIS, D.A. & THOMAS, A.G. A microautoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedling (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany*, Oxon, 29: 147-57, 1978.
- MURALIDHARAM, E.M. & MASCARENHAS, A.F. "in vitro" planted formation by organogenesis in *E. camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Reports*, Heidelberg, 6: 258-9, 1987.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for growth and bioassays in tobacco tissue cultures. *Physiology Planta-*

rum, Copenhagen, 15(3): 473-97, 1962.

NKANKA, B.K. Techniques de micropropagation d' *Eucalyptus rudis* Endl., par la culture de noeuds *in vitro*. In: COLLOQUE SUR LA CULTURE *in vitro* DES ESSENCES FORESTIÉRES. IUFRO, Nangis, 1981. Gembloux-France, AFOCEL, 1982, p.135-42.

NKANKA, B.K. Influence de la vitamine E sur la multiplication végétative *in vitro* de l' *Eucalyptus rudis* Endl., de *Larix x europaeus*. Henry et de *Quercus borealis* Mich. Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux, Gembloux, 17(3): 219-26, 1982.

NOWAKI, J. & BANDURSKI, R.S. Myo-inositol esters of indole-3-acetic acid as seed auxin precursors of *Elaeagnus* L. Plant Physiology, Bethesda, 65: 422-7, 1980.

RAO, K.S. & VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. Plant Science, Limerick, 40: 51-5, 1985.

RAPPAPORT, L. Plant growth hormones: internal control points. Botanical Gazette, Chicago, 141(2): 125-30, 1980.

REID, J.B. & MURFET, I.C. Flowering in *Pisum*: the effect of genotype, plant age, photoperiod and number of inductive cycles. Journal of Experimental Botany, Oxon, 28: 811-9, 1977.

REINECK, D.M. & BANDURSKI, R.S. Auxin biosynthesis and metabolism. In: DAVIES, P.J., ed. Plant hormone and their role in plant growth and development. Dordrech, Kluwer Academic, 1986. p.24-41.

- SCHOELLER, W. & GOEBEL, H. Die wirkung des Follikelhormons auf Pflanzen II. *Biochemische Zeitschrift*, Berlin, 251: 223-8, 1932.
- SETHI, H. & MUKHERJEE, G. Biochemistry and molecular biology of competence of plant cell differentiation and regeneration *in vitro* - areview. *Current Science*, Bangalore, 59(6): 308-11, 1990.
- SHULT, D.A. & COX, R.I. Steroid and phytoestrogen binding to sheep uterine receptores *in vitro*. *Journal of Endocrinology*, Bristol, 52: 299-310, 1972.
- SIEGEL, S.M. & HALPERN, L.A. The effect of branching at C-1 on the biological activity of alcohol. *Proceedings of the National Academic Science of United States*, Washington, 51: 765-8, 1964.
- SIRONVAL, C. Experiences sur l' isolement et la floraison des plants de *Fragaria vesca* L., var. *semperflorens* Duch. *Lejeunia*, Liege, 12: 29, 1948.
- SITTON, D.T.C. & KENDE, C. Decreased cytokinin production in the roots as a factor in shoot senescence. *Planta*, Heidelberg, 73: 296-300, 1967.
- SKOOG, F.; HAMZI, H.Q.; SZWEYKOWSKA, M.; LEONARD, N.J.; CARRAWAY, K.L.; FUGII, T.; HEGELSON, J.D.; LEOPPKY, R.W. Cytokinins: structure/activity relationships. *Phytochemistry*, Oxford, 6: 1169-92, 1967.
- SPIEGEL, J.; JONES, E.; SNYDER, B.W. Estradiol - 17β interference with meiotic maturation in *Rana pipiens* ovarian follicles: evidence for inhibition of 3β -hydroxysteroid de hydrogenase. *Journal of Experimental Zoology*, New York, 204: 187-92, 1978.

- STADEN, V.J. & WAREING, P.R. The effect of photoperiod on level of endogenous cytokinins in *Xanthium strumarium*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 27: 331-7, 1972.
- STOHS, S.J. & ROSENBERG, H. Steroids and steroid metabolism in plant tissue cultures. *Lloydia*, Pittsburg, 38(3): 181-94, 1975.
- STOWE, B.B. Growth promotion in pea epicotyl sections by fatty, acid esters. *Science*, Washington, 128: 421-8, 1958.
- STOWE, B.B. The stimulation of auxin action by lipides; plant growth regulations. Ames, The Iowa State University Press, 1961. 419p.
- STOWE, B.B. & OBREITER, J. Growth promotion in pea stem sections. II. By natural oils and isoprenoid vitamins. *Plant Physiology*, Bethesda, 37: 158-164, 1959.
- STOWE, B.B. & DOTTS, M.A. Probing a membrane matrix regulating hormone action. I. The molecular length of effective lipids. *Plant Physiology*, Bethesda, 48: 559-65, 1971.
- TAIZ, L. Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annual Review of Plant*, Palo Alto, 35: 585-657, 1984.
- TANCZOS, O.G.; ERDEI, L.; VIGH, L.; KUIPERS, B.; KUIPER, P.J.C. Effect of α tocopherol on growth, membrane-bound adenosine triphosphatase activity of the roots, membrane fluidity and potassium uptake in rice plants. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 55: 289-95, 1982.
- THOMPSON, N.P. & JACOBS, W.P. Polarity of IAA effect on sieve - tube and xylem regeneration in coleus and tomato

sterus. *Plant Physiology*, Bethesda, 41: 673-82, 1966.

TOMITA, Y. UOMORI, A. & MINATO, Y. Steroidal sapogenins and sterols in tissue cultures of *Dioscorea tokoro*. *Phytochemistry*, Oxford, 9: 111, 1970.

TREWAVAS, A.J. How do plant growth substances act? *Plant Cell and Environment*, Oxford, 4: 203-8, 1981.

TREWAVAS, A.J. Growth substance sensitivity: the limiting factor in plant development. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 55: 60-72, 1982.

TREWAVAS, A.J. & CLELAND, R.E. Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances? *Trends in Biochemical Sciences*, Cambridge, 8: 354-7, 1983.

VALIO, F.M. Auxinas. In: FERRI, M.G. *Fisiologia vegetal*. 2.ed. São Paulo, Ed. Pedagógica, 1986. v.2, p.39-72.

VESPER, M.J. Use of a pH - response curve to predict apparent wall pH in elongating segments of maize coleoptiles and sunflower. *Planta*, Heidelberg, 166: 96-104, 1985.

WETMORE, R.H. & JACOBS, W.P. Studies on abscission; the inhibiting effect of auxina. *American Journal of Botany*, Columbus, 40: 272-8, 1953.

WICKERS, H.J. PEETSMA, G.J.; MALINGRE, T.M.; HUIZING, H.J. Purification and properties of a phenol oxidase derived from suspension cultures of *Mucuna pruriens*. *Planta*, Heidelberg, 60: 106-12, 1984.

WILDMAN, S.G.; FERRI, M.G.; BONNER, J. The enzymatic conversion of tryptophan to auxin by spinach leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Duluth, 13(1): 131-44, 1947.

ZHANG, P.F.; NI, D.X.; WANG, K.J.; BAD, Z.H. Effects of plant hormones on callus growth and organogenesis in *Eucalyptus botryoides* "in vitro". *Eudan J.*, 21(4): 445-52, 1982.

APÊNDICE

A₁ : Meio de Cultura Gonçalves (1980) modificado (MG₂)

Composição do meio de cultura

COMPOSIÇÃO DE SAIS	(SOLUÇÕES ESTOQUE) mg/l
1. NH_4NO_3	800
2. KNO_3	1000
3. KH_2PO_4	170
4. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236
5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
6. $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
7. H_3BO_3	6,20
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,70
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,00
KI	0,75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,03
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25

Sais de Gonçalves (1980) modificado

	mg/l
8. Tiamina	5,0 mg/l
9. Piridoxina	0,5 mg/l
10. Ácido Nicotínico	0,5 mg/l
11. Pantetonato de cálcio	1,0 mg/l
12. Sacarose	30 g/l
13. Inositol	100 mg/l
14. Agar	8 g/l
15. Benzilaminopurina (BAP)	0,2 mg/l
16. pH = 5,7	