MORFOGÊNESE "IN VITRO" DE DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES
EM PROGÊNIES DE *Pinus caribaea* MORELET VAR. *hondurensis*
BARR. ET GOLFARI

ARACI APARECIDA DA SILVA
Engenheiro Florestal

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1989

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Silva, Araci Aparecida da
S586m Morfogênese "in vitro" de diferentes tipos de
120 NOV 1989 explantes em progênies de Pinus caribaea Morelet
var. hondurensis Barr. et Golfari. Piracicaba,
1989. 149p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Cultura de tecido vegetal 2. Pinheiro - Cul-
tura de tecido 3. Pinheiro - Melhoramento 4. Pinhei-
ro - Morfogênese "in vitro" 5. Pinheiro - Plântula -
Explante 6. Pinheiro - Progênie I. Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 634.9751

MORFOGÊNESE "IN VITRO" DE DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES
EM PROGENIES DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*
Barr. et Golfari

ARACI APARECIDA DA SILVA

Aprovada em: 10/11/89

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

ESALQ/USP

Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama

ESALQ/USP

PqC. IV Dr. João Batista Baitello

INSTITUTO FLORESTAL - SP.

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

- Orientador -

Aos meus pais Benedito ("in memorium")
e Senhorinha, pelo exemplo,

DEDICO

Aos meus,

irmãos, Benedito, Ivani ("in memorium"), Claudemir, Antonia, Sandra Regina e Regiane;

sobrinhos, Gustavo ("in memorium"), Sandra Regina, Ana Cláudia, Liliam, Guítherme e Luiz Fernando;

primos, Rogério, Luciana e Edemilson;

amigos, pela solidariedade,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu a Vida e a oportunidade para a realização deste trabalho, e a todos aqueles que me auxiliaram nesta etapa tão importante e difícil de minha formação profissional, com especial deferência para:

- Antonio Natal Gonçalves, pela amizade, orientação e estímulos ao crescimento durante a jornada;
- Paulo Yoshio Kageyama, pela valorização, incentivo e apoio ao meu trabalho;
- Instituto Florestal de São Paulo, na pessoa de seu Diretor Geral - João Régis Guillaumon, pelo consentimento e apoio para a realização do Curso de Pós-Graduação;
- Edegar Giannotti, meu superior imediato, pelo irrestrito apoio e crédito;
- CAFMA, Companhia Agro Florestal Monte Alegre - Agudos-SP, na pessoa de Márcio Ferrari, pela cessão das sementes, para realização da fase experimental;
- Massanori Takaki e Graci Mirian Corso, do Departamento de Botânica da UNESP/Rio Claro, pelas sugestões na fase experimental e revisão bibliográfica;
- Fábio Poggiani, Marcílio de Almeida e Luiz Carlos Estraviz Rodrigues, pelas sugestões e colaboração na condução da fase experimental e digitação dos dados;

- Milton Thadeu Zarate do Couto e João Luiz Ferreira Batista, que concederam apoio e orientação para a realização da análise e interpretação dos dados experimentais;
- Gonçalo Mariano, Cibeles de Souza Machado Crestana, Onildo Barbosa e Ana Cristina Machado Franco Siqueira, pelo auxílio nas fases experimentais e apoio no decorrer deste trabalho;
- Sidnei Pereira Rocha, José Roberto Romanini, Maria Aparecida Rizzato, Lúcia Maria Conceição de Sousa, Vera Lúcia Buch, Alba Maria Masetto, Elza Martins Ferraz, Márcia Maria de Lima, Cláudio Roberto Ribeiro, Marilda Borges dos Santos, Adão Luiz Castanheiro Martins, pela amizade e colaboração em todas as fases deste trabalho;
- Benedito Márcio da Silva, Antonia Aparecida da Silva e Sandra Regina da Silva, pelo apoio logístico, levantamento e tabulação dos dados, além dos feriados, sábados, domingos e noites em claro;
- Marina Murayama, Benedito Aluísio S. Pereira, Adriana Rodrigues, David Luciano Rosalen, Maria Alice de Oliveira e Osni Thadeu de Aguiar, pela amizade, colaboração e estímulo;
- Plínio de Souza Fernandes, Reinaldo Cardinali Romanelli, Antonio Orlando da Luz Freire Neto, João Luiz de Moraes e Francisco José do Nascimento Kronka, pelos incentivos constantes nas horas de esmorecimento;
- Wandir Ribeiro, Celso Awer, Silvana Paes Cangiani, Lucila Maria Calheiros Silvestre e Ivone Calheiros, por saber me ouvir nos momentos de desabafo;

- Celina Ferraz do Valle, Roberto Chiaranda, Edson Seizo Mori, Valderês Aparecida de Sousa, Antonio Figueiredo Moreira, Marília Figueira Reis, Crisomar da Silva Lobato, pelos cinco anos de companheirismo na escola da vida e do conhecimento;
- Lourdes Aparecida Rocha Carvalho por mostrar e ensinar os caminhos do conhecimento e do coração;
- Paulo Gonçalves, por me auxiliar na compreensão da realidade dos fatos;
- Luiz Carlos Bottene Júnior, por possibilitar que a chama da vida não se extinguísse antes da conclusão desta tão difícil jornada;
- Maria Helena M.O. Rodrigues pelas sugestões, datilografia e apoio à arte final;
- Maria Clotilde Bartochio Cunha e Maria de Fátima Durrer Jualiani, pela colaboração administrativa nos momentos difíceis;
- Marialice Metzker Poggiani e Sueli Bressano pelo auxílio bibliotecário prestado;
- ... e aquele amigo, que certamente existirá que me apoiou e ficou ausente desta relação.

Em verdade, estas páginas condensam uma infinitésima fração de toda a energia envolvida para a concretização deste trabalho!

Na manifestação da vida, onde a simplicidade, a pureza, o amor, o respeito e o trabalho, regem a tônica da evolução, a real grandeza desta experiência é impossível de ser dimensionada, considerando que os valores envolvidos ~~em~~ se encontram fracionados, em cada um dos colaboradores, dentro da sua Unidade do Micro ao Macrocosmos.

Araci.

S U M Á R I O

Página

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xvii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Descrição da espécie	5
2.1.1. Classificação	5
2.1.2. Descrição da variedade <i>hondurensis</i>	8
2.1.2.1. Região de ocorrência natural .	8
2.1.2.2. Descrição botânica da variedade <i>hondurensis</i>	11
2.1.2.3. Importância econômica	15
2.2. Clonagem de espécies arbóreas via cultura de células e tecidos	16
2.2.1. Histórico e fundamentos	16
2.2.2. Aspectos da cultura de tecido em coníferas, com especial atenção para as espécies do gênero <i>Pinus</i>	25
2.2.2.1. Meio de cultura	26
2.2.2.2. Fatores ambientais na cultura.	44
2.2.2.3. O explante	51

	Página
3. MATERIAL E MÉTODOS	62
3.1. Material	62
3.1.1. Local do experimento	62
3.1.2. Escolha da espécie em estudo	62
3.1.3. Origem das sementes e explantes	63
3.1.4. Meio de cultura	63
3.1.5. Recipientes utilizados para a cultura .	65
3.1.6. Condições ambientais de cultura	65
3.1.7. Outros materiais utilizados	65
3.2. Método	67
3.2.1. Germinação das sementes	67
3.2.2. Implantação da cultura "in vitro"	67
3.2.3. Avaliação	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1. Produção de células não organizadas (calo) ...	84
4.2. Produção de células organizadas (gemas)	110
4.3. Sobrevivência	117
4.4. Superfície morfológica de diferenciação	120
5. CONCLUSÕES	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
APÊNDICES	139

LISTA DE FIGURAS

Figura nº	Página
1. Estrutura interna das sementes de duas espécies de <i>Pinus</i> sp.	13
2. Plântulas de <i>P. edulis</i> em diferentes estádios evolutivos	14
3. Apresentação esquemática da plântula de <i>P. caribaea</i> Morelet var. <i>hondurensis</i> Barr. et Golf., com 18 dias do início da germinação e sua respectiva divisão, indicando os diferentes tipos de explantes	69
4. Segmentos hipocotilar de estágio evolutivo E0, em detalhe da superfície morfológica de diferenciação (superfície lisa)	140
5. Vista da superfície morfológica de diferenciação .	141
6. Calo da classe evolutiva 1 (início), em segmento hipocotilar de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> , com 7 dias de cultivo	142
7. Vista de um segmento cotiledonar de estágio evolutivo 2, para produção de calo, após 7 dias de cultivo	143
8. Vista em detalhe de um calo de estágio evolutivo 3, de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> , com 25 dias de cultivo	144
9. Vista da superfície morfológica de diferenciação, de um explante de extremidade cotiledonar, com primórdios de gema de estágio evolutivo G0, por organogênese direta.....	145

Figura nº

Página

10. Superfície morfológica de diferenciação de um explante de extremidade cotiledonar, com primórdios de gema de estágio evolutivo G0 (intermediário), por organogênese direta 146
11. Superfície morfológica de diferenciação de um explante hipocotilar, com primórdios de gemas de estágio evolutivo G1, por organogênese indireta 147
12. Em detalhe, vista lateral de uma gema de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, produzida por organogênese indireta 148
13. Em detalhe, close da morfogênese de um primórdio de raiz de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* produzido por organogênese indireta (rizogênese) 149

LISTA DE TABELAS

Tabela nº	Página
1. Composição química do meio de cultura utilizada como base para o estabelecimento e manutenção da cultura de <i>Pinus</i> "in vitro"	64
2. Média das temperaturas semanais, noturnas e diurnas ($^{\circ}\text{C}$), com as respectivas amplitudes de variação ocorridos no interior da câmara de diferenciação, durante a fase experimental	66
3. Comprimento médio (cm) dos diferentes explantes (E.0 para produção de calo e G.1 para produção de gemas) por matriz, obtidos de 10 plântulas de progênies e por tipo de explante, desvio padrão das médias, número de folhas cotiledonares de maior frequência, nas plântulas consideradas/matriz de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	73
4. Quadro demonstrativo dos dados das médias dos pesos frescos e secos (g) e das porcentagens de umidade e de matéria seca, da muda inteira e por explante, no estágio inicial da cultura (E.0 para produção de calo e G.1 para produção de gemas) das diferentes progênies	74
5. Notas evolutivas atribuídas comparativamente aos estádios evolutivos dos explantes para produção de calo no decorrer da fase experimental	78

6. Notas evolutivas atribuídas comparativamente aos estádios evolutivos dos explantes, para o crescimento e produção de gemas, no decorrer do período experimental 79

7. Figura demonstrativa do número observado de explantes da extremidade cotiledonar (a.0), nos diferentes estádios evolutivos, para a produção de calo, nas três avaliações realizadas (7, 25 e 100 dias) durante o período de cultivo 85

8. Figura demonstrativa do número observado de explantes cotiledonares próximos ao ápice caulinar (a.1) nos diferentes estádios evolutivos, para a produção de calo, nas três avaliações realizadas (7, 25 e 100 dias) durante o período de cultivo 86

9. Figura demonstrativa do número observado de explantes cotiledonares - nós (b.0), nos diferentes estádios evolutivos para a produção de calo, nas três avaliações realizadas (7, 25 e 100 dias) durante o período de cultivo 87

10. Figura demonstrativa do número observado de explantes hipocotilares (C.0), nos diferentes estádios evolutivos para a produção de calo, nas três avaliações realizadas (7, 25 e 100 dias), durante o período de cultivo 88

11. Figura demonstrativa do número observado de explantes do hipocótilo (C.1), nos diferentes estádios evolutivos, para a produção de calo, nas três avaliações realizadas (7, 25 e 100 dias), durante o cultivo	89
12. Figura demonstrativa do número observado de explantes hipocotilares (C.2), nos diferentes estádios evolutivos, para a produção de calo, nas três avaliações realizadas (7, 25 e 100 dias), durante o período de cultivo	90
13. Freqüências observadas para o número de explantes com ocorrência ou não do início do processo morfogênico (calo), após 7 dias de cultivo	92
14. Freqüências observadas para o número de explantes com ocorrência ou não de processo morfogênico (calo), após 25 dias de cultivo	100
15. Freqüências observadas para o número de explantes com ocorrência ou não do processo morfogênico (calo), após 100 dias de cultivo	103
16. Quadro demonstrativo das médias dos pesos frescos e secos (g) e percentuais médios de umidade e de matéria seca dos diferentes explantes dentro das classes evolutivas adotadas	109

Tabela nº

Página

17. Freqüências observadas para os explantes com ocorrência ou não de processo morfogênico (gema), após 7 dias de cultivo	111
18. Freqüências observadas para os explantes com ocorrência ou não do processo morfogênico (gema), após 25 dias de cultivo	113
19. Freqüências observadas para os explantes com ocorrência ou não de processo morfogênico (gema), após 100 dias de cultivo	115
20. Freqüências observadas para os explantes vivos após 7 dias de cultivo	118
21. Freqüências observadas para os explantes sobreviventes após 25 dias de cultivo	118
22. Freqüências observadas para os explantes vivos após 100 dias de cultivo	120
23. Freqüências observadas para alterações (rugosidade) na superfície morfológica dos explantes após 7 dias de cultivo	123
24. Freqüências observadas para as alterações (rugosidade) na superfície morfológica dos explantes após 25 dias de cultivo	123
25. Freqüências observadas para as alterações (rugosidade) na superfície morfológica dos explantes após 100 dias de cultivo	124

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- AIA = ácido indolil-2-acético
- AIB = ácido indol-3-butírico
- ANA = ácido naftaleno acético
- 6 BAP = 6-benzilaminopurina
- BENLATE= metil-1-(butilcarbomoil)-2-D-benzimidazol carbamato
benomil
- DNA = ácido desoxirribonucleico
- H₂O₂ = peróxido de hidrogênio 20 volumes
- MS = meio de MURASHIGE & SKOOG (1962)
- NEANTINA= 1,5% Hg em acetato mercuri-fluídico
- RNA = ácido ribonucleico

MORFOGÊNESE "IN VITRO" DE DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES
EM PROPAGÂNCIAS DE *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*
Barr. et Golfari

Autor: ARACI APARECIDA DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do uso de diferentes tipos de explantes de plântulas de progênie de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. et Golf. para a obtenção de organogênese direta e indireta através da cultura de tecidos.

Plântulas com 18 dias de germinação foram utilizadas para a obtenção dos seguintes explantes: segmentos hipocotilares, nã e segmentos cotiledonares. Os explantes foram cultivados na variação da composição de sais de MURASHIGE & SKOOG M.S. (1962), complementado com AIB, ANA e 6 BAP, sob fotoperíodo de 16/8 com 900 lux, 50% fornecido por lâmpadas fluorescentes luz do dia e 50% por lâmpadas Grolux em temperatura média de $27,11 \pm 1,16^{\circ}\text{C}$. As avaliações foram feitas aos 7, 25 e 100 dias de cultura.

A análise dos resultados permitiram as seguintes conclusões:

1. Segmentos cotiledonares, hipocotilares e no cotiledonar de plântulas recém-germinadas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, cultivados "in vitro" mostraram variabilidade na capacidade de indução e produção de calo entre os diferentes tipos e fontes de explantes;
2. Os calos obtidos surgiram das camadas celulares mais internas da epiderme e foram friáveis, verdes ou amarelo claro;
3. Houve variabilidade na capacidade para produção de massa fresca e massa seca produzida entre os diferentes tipos e fontes de explantes;
4. A capacidade para a produção de calo entre os diferentes tipos e fontes de explantes na ordem da apresentação foram: extremidades cotiledonares, segmentos hipocotilares, no cotiledonar e, finalmente, o segmento cotiledonar próximo ao no;
5. A cultura de calo por período superior à 25 dias, "sem transferência", mostrou tendências ao escurecimento, sem aparente dano à produção de calo;
6. Houve organogênese direta, produção de gemas em segmentos cotiledonares, hipocotilares e no cotiledonar, de plântulas recém-germinadas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* cultivados "in vitro", mostrando variabilidade

nessa capacidade entre os diferentes tipos e fontes de explantes, após a passagem para meio de cultivo sem reguladores de crescimento;

7. Os explantes que apresentaram maior capacidade à morfogênese via organogênese direta, na ordem seqüencial da apresentação foram: extremidades cotiledonares, segmentos hipocotilares, segmentos cotiledonares próximos ao nó e, finalmente, o nó cotiledonar;
8. As gemas obtidas surgiram em grupos sobre a superfície morfológica dos diferentes tipos e fontes de explantes;
9. As condições ambientais e químicas das culturas, foram satisfatórias e suficientes para permitir a sobrevivência dos explantes acima de 67,40% durante os 100 dias de cultivo;
10. Houve variabilidade na aparência rugosa da superfície morfológica, dentre os diferentes tipos de explantes que apresentaram capacidade à rugosidade na epiderme de diferenciação. Na ordem seqüencial foram: segmentos da extremidade cotiledonar, nó cotiledonar, segmentos cotiledonares próximos ao nó e segmentos hipocotilares.

MORFOGENESIS "IN VITRO" OF DIFFERENTS TYPES OF EXPLANTS
FROM *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*
Barr. et Golf. PROGENIES

Author: ARACI APARECIDA DA SILVA

Adviser: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

SUMMARY

The objective of this work was to study the effects of the use of different types on explants from *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. et Golf. progenies to obtain direct and indirect organogenesis through tissue culture.

Seedlings with 18 days after germination were utilized to obtain the following explants: hypocotyl sections, cotyledonary node and cotyledon sections. The explants were cultured in the variation of basic MURASHIGE & SKOOG-M.S. (1962) medium complemented with IBA, ANA and 6 BAP under photoperiod of 16/8 hours with 900 lux given by 50% fluorescent lamps daylight and 50% Gro-lux lamps; and mean temperature of $27.11 \pm 1.16^{\circ}\text{C}$. The evaluations were made at 7, 25 and 100 days of culture.

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

1. Cotyledon and hypocotyl sections and cotyledonary node showed variability in the capacity for callus induction and production among different types and some of explants;
2. The calli arose from inner cell layers of the epidermis and were friable, green and light yellow;
3. There was variability in the capacity for callus fresh and dry weight produced among the different types and sources of explants;
4. The capacity for callus production among the different types and sources of explants in the following order were: cotyledon tips, hypocotyl sections, cotyledonary node and cotyledon sections near the shoot;
5. Callus culture for periods above 25 days without transferring showed trend to browning without apparent damage to callus production;
6. There was direct organogenesis, shoot production, in cotyledon and hypocotyl sections and cotyledonary nodes showing variability in this capacity among different types and sources of explants after transferring to media without growth regulators;

7. The explants that showed higher capacity for morphogenesis, direct organogenesis were in the following order: cotyledon tips, hypocotyl sections, cotyledon sections from near the shoot and the cotyledonary node;
8. The shoots obtained arose in groups on the morphologic surface in the different types and sources of explants;
9. The environmental and chemical conditions for culture were satisfactory and sufficient to allow the survival of the explants above 67.40% during the 100 days of culture;
10. There was variability on the rugose appearance of the morphologic surface in the different types and sources of explants and those that showed higher rugosity in the differentiation surface were in the following order: cotyledon tip sections, cotyledonary nodes, cotyledon sections from near the shoot and hypocotylary sections.

1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Pinus* vêm se destacando como uma das mais importantes para o florestamento e reflorestamento no Brasil. Segundo KAGEYAMA (1980), esse gênero contribuía com 35% da área plantada no país em 1977, sendo os restantes 65% constituídas por plantações de espécies de *Eucalyptus*. Enfatizava ainda o autor, uma tendência crescente nos últimos anos, ao predomínio de plantios com espécies de *Pinus*, visto destacarem-se, não somente pela qualidade da madeira como fonte de celulose de fibra longa, como também, pela produção de goma resina.

A demanda de madeira pelos diversos setores da economia é maior que a oferta existente, tornando latente a necessidade de pesquisas e emprego de novas técnicas na seleção, produção de mudas, implantação, cultivo e manejo dos plantios, resultando em maior produtividade dos talhões, melhor qualidade da matéria-prima, menor tempo de produção e menores custos.

A clonagem de essências arbóreas florestais é uma das técnicas empregadas nesse processo, através da qual

procura-se reproduzir indivíduos com as mesmas características genéticas da árvore matriz. Entre as técnicas convencionais de clonagem destacam-se: enxertia, alporquia e enraizamento de estacas, as quais têm solucionado parcialmente os problemas da rápida e abundante reprodução de material selecionado, sendo que alguns problemas perduram, como a incompatibilidade na enxertia, dificuldade de enraizamento na estaquia, quantidade de indivíduos produzidos por ortete dentre outros fatores.

A clonagem através da cultura de células e tecidos em espécies arbóreas é recente, e vem se realizando com relativo sucesso há algum tempo. As primeiras tentativas datam de 1924 e somente 40 anos mais tarde foi possível obter plântulas completas do material utilizado, com desenvolvimento normal após o plantio definitivo.

A cultura de tecidos baseia-se na totipotência ou competência celular, permitindo o cultivo de células vegetais não diferenciadas e sua posterior organização em "plântulas" completas através de respostas aos estímulos produzidos em função de alterações no meio de cultura, da luminosidade, do fotoperíodo e da temperatura. Isto possibilita a multiplicação de indivíduos resultantes de combinações genéticas, sexualmente transmissíveis e não transmissíveis, e de interações difíceis de serem reproduzidas num pomar clonal de polinização aberta. Torna viável, também, o estudo das exigências nutricionais, do metabolismo, da fisiologia celular, da mani-

pulação genética para o melhoramento, além de estudos dos fenômenos da morfogênese e diferenciação celular "in vitro".

Estudos têm revelado que toda e qualquer parte do tecido vegetal tem condições de se desenvolver e regenerar a plântula inteira se determinados estímulos são fornecidos. Para tanto, tecidos da raiz, caule, folha, câmbio, entre outros, têm dado origem a calos, os quais se diferenciam posteriormente em brotos e/ou raízes, embriões, ou continuam a crescer sem organização.

DURZAN (1984) e GEORGE & SHERRINGTON (1984) afirmam que a rapidez na formação de órgãos (brotos, raízes ou embriões), ou o aparecimento de calos, depende muito das condições nutricionais e estados fisiológicos do explante original, bem como do balanço hormonal do meio colocado, evidenciando a possibilidade da existência de influência da origem do explante sobre a qualidade e rapidez das manifestações morfogênicas.

Muito embora, haja necessidade de mais informações sobre as demais espécies de *Pinus*, importantes para o mercado brasileiro, quanto ao emprego de técnicas de cultura de células e tecidos, escolheu-se o *Pinus caribaea* var. *hondurensis* pelo seu valor no mercado atual e potencial futuro.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo testar a viabilidade e uso de técnicas de cultura de

tecidos como alternativa na clonagem de *P. caribaea* var. *hondurensis*, com o intuito de:

a) fornecer subsídios ao aprimoramento e uso das técnicas de cultivo "in vitro" desta variedade de *Pinus*;

b) obtenção da cultura de calo e gema a partir de diferentes segmentos de plântulas germinadas em condições de laboratório.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

2.1.1. Classificação

O material estudado é classificado botanicamente no sistema Engleriano, por Pilger¹, citado por MIROV (1967), como pertencente à Divisão IV-Espermatófitas, Subdivisão Gymnospermae, Classe das Coniferales, da Ordem Coniferae, Família Pinaceae, Tribo Pinoideas, Gênero *Pinus*, Subgênero *Diploxylon*, Espécie *caribaea* e variedade *hondurensis*.

Segundo Engler & Diels², citados por HARDLOW & HARRAR (1969), dizem que as gimnospermas são divididas em 4 ordens, 12 famílias, 63 gêneros e cerca de 675 espécies. Comercialmente, a ordem Coniferae é mais importante, enquanto que as demais apresentam maior interesse científico que econômico. Ainda estes mesmos autores, afirmam que esta ordem compreende cerca de 7 famílias, abrangendo 48 gêneros e aproxima

¹ PILGER, R. Genus *Pinus*. In: ENGLER, A. & PRANTL, K. Die natürlichen pflanzenfamilien. Leipzig, Wilhelm Engelmann, 1926. v.13, p. 331-42. (Gymnospermae).

² ENGLER, A. & DIELS, L. "Syllabus der pflanzenfamilien". Aufl 11, Berlin, 1936.

damente 520 espécies, embora DARLIMORE & JACKSON (1966) confirmassem posteriormente a existência de apenas 6 famílias, 52 gêneros e 566 espécies.

A família Pinaceae, é a maior e mais importante da ordem Coniferae, abrangendo 9 gêneros e cerca de 210 espécies, englobando o gênero *Pinus* que é o principal gênero das coníferas. Este gênero, abrange cerca de 90 espécies, amplamente distribuídas pelo Hemisfério Norte até os países subtropicais e tropicais, nas Índias Ocidentais, Arquipélago das Filipinas, Antilhas, Ilhas Bahamas, México, Guatemala, Honduras e Nicarágua, com maior ocorrência no sudeste do Hemisfério Norte, nos climas temperados, mas sem ultrapassar o Equador. Segundo MIROV (1967), o gênero *Pinus* não ocorre naturalmente no Hemisfério Sul, com exceção do *Pinus merkusii* que ultrapassa a linha equatorial em Sumatra.

Segundo a classificação de Pilger¹, citado por VIDAL (1962) e MIROV (1967), são agrupadas de acordo com as características morfológicas de alguns órgãos e número de folhas. As espécies do gênero *Pinus* se dividem nas seguintes seções: Haploxyton, que encerra os pinhos brancos, não resinosos, cuja folhagem é constituída por fascículos de 5 folhas aciculares; e Diploxyton, que abrange os pinhos produtores de madeira mais clara, colorida, resinosa, com duas folhas aciculares por fascículo foliar.

Dentre as espécies da seção Diploxyton encontra-se a do *Pinus caribaea* Morelet, que segundo MIROV (1967) e LAMB (1973), ocorre em populações naturais, com o *Pinus elliottii* var. *densa* (no sul da Flórida), *Pinus occidentalis*,

Pinus cubensis e *Pinus tropicalis*. Antes da classificação de Look³, citado por LAMB (1973), o nome *P. caribaea* era empregado não somente para os pinhos das Bahamas, pinho macho do oeste de Cuba e as procedências continentais, agora inclusas, mas também para os *P. elliottii* var. *elliottii* e *P. elliottii* var. *densa*, do sul dos Estados Unidos.

Look³, citado anteriormente, constatou diferenças botânicas suficientes para garantir a identidade do *Pinus caribaea* como uma espécie distinta. Estas diferenças foram posteriormente confirmadas em estudos realizados por Willians⁴, citado por MIROV (1967); Little & Dorman⁵, Barret & Golfari⁶ e Lückhoff⁷, citados por LAMB (1973), concluíram que o nome *Pinus caribaea* Morelet seria aplicado somente para os pinhos originários das Bahamas e Ilha de Caicós, oeste de Cuba e da América Central. Taxonomicamente, no entanto, cada origem tem caracteres que constituem uma taxa, que compõem as 3 variedades a saber:

³ LOOCK, E.E.M. The pines of Mexico and British Honduras. Bull. Dept. of For. S. Afr., 35: 1-244, 1950.

⁴ WILLIAMS, L. *Pinus caribae*. Ceiba, 4: 299-300, 1955.

⁵ LITTLE, E.L. & DORMAN, K.W. Slash pine (*P. elliottii*) its nomenclature and varieties. J. For., 50(12):918-23, 1952.

⁶ BARRETT, W.H.G. & GOLFARI, L. Description de dos nuevas variedades del "Pino de Caribe". Carib. For., 23(2), 1962.

⁷ LÜCKHOFF, H.A. The natural distribution, growth and botanical variation of *Pinus caribaea* and its cultivation in South Africa. Annale Univ. van Stellenbosch, 39 (serie A), 1. 1964.

- a) *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* - típico de Cuba e da Ilha dos Pinos;
- b) *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. et Golf., da América Central;
- c) *Pinus caribaea* Morelet var. *bahamensis* Barr. et Golf., das Ilhas dos Caicós e Bahamas.

Essas três variedades estão amplamente separadas umas das outras pelo Golfo do Caribe. Embora ocupem posições de relevo entre as cultivadas nas áreas reflorestadas brasileiras, as observações que se seguem concentrar-se-ão na variedade *hondurensis*, que forneceu o material para esta pesquisa.

2.1.2. Descrição da variedade *hondurensis*

2.1.2.1. Região de ocorrência natural

a) Distribuição

O *P. caribaea* Morelet var. *hondurensis* ocorre, de acordo com LAMB (1973), entre as latitudes de 20°00' e 12°13' norte, e 82°33' a 89°25' de longitude oeste, englobando parte setentrional, planícies costeiras e colinas das Honduras Britânicas (atual Belize), localidades isoladas do norte

da Guatemala, Ilhas Guanajos, Costa setentrional, vales montanhosos, e extensa região da costa leste de Honduras e Nicarágua. CIANCIULLI (1961) e MIROV (1967), apontam a ocorrência desta variedade, em grande parte do México, estendendo-se geograficamente para aproximadamente 30° de latitude norte e 110° de longitude oeste.

Em termos de altitude, são encontrados desde locais próximos ao nível do mar até 1000 m nas Honduras Britânicas (atual Belize), e altitudes menores na Guatemala e Nicarágua.

b) Características climáticas

Segundo LAMB (1973), a característica climática preponderante na região de ocorrência é a existência de duas estações bem definidas: verão quente e úmido e inverno seco, livre de geadas. Nesta região, os ventos são constantes durante o ano, sendo no entanto, mais fortes nos meses de fevereiro a setembro, com ocorrência de furacões ao longo da região costeira entre junho e final de outubro. Ventos frios acontecem durante o mês de novembro e ocasionalmente de dezembro a janeiro, e nessas ocasiões, a temperatura pode cair abaixo de 5°C .

Segundo este mesmo autor, a precipitação média anual nas savanas costeiras setentrionais das Honduras Britâ-

nicas é de aproximadamente 1500 mm, atingindo um valor máximo de 3200 mm aos 12°13' de latitude norte.

Para a temperatura, este autor diz que, a região de Belize apresenta grande variação. Durante o inverno, a mesma pode cair abaixo dos 5°C, enquanto que no verão, pode chegar aos 37°C. Já na região costeira, a temperatura raramente atinge valor abaixo de 15,6°C, ou acima de 32,3°C, sendo desconhecida a ocorrência de geadas. Na costa leste de Honduras e Nicarágua, a variação da temperatura é menor, apresentando a mínima de 23,9°C e máxima de 29,4°C.

c) Características edáficas

De acordo com LAMB (1973), a variedade *hondurensis* não tolera solos pouco arejados e com camadas de argila. Apresenta-se com boa performance, em solos arenosos e sílticos, alcançando melhor crescimento nos bancos arenosos dos rios. Estes solos são geralmente ácidos, com pH entre 4,0 e 5,5, pobres em nutrientes, com textura que permite boa aeração do sistema radicular. A profundidade dos solos, afeta diretamente o seu crescimento em altura. Nas colinas, onde o solo apresenta-se com boa profundidade, a variedade atinge acentuado crescimento em altura, apresentando-se entretanto, com estatura reduzida, em locais de solos rasos.

2.1.2.2. Descrição botânica da variedade *hondurensis*

Ainda segundo LAMB (1973), a variedade *hondurensis* apresenta-se com folhas aciculares, abertas em cachos nas extremidades dos ramos, e persistentes por dois anos. As folhas são dispostas em fascículos de 3, algumas vezes 4, 5 (e 6 nas árvores jovens). Apresenta-se com 15 a 25 cm de comprimento, de secção triangular, com aproximadamente 1,5 mm de largura, bordos serreados, rígidas, de cor verde escura ou amarelecida, ligeiramente brilhante. Os estômatos se distribuem em linha e em toda a sua superfície, sendo que as folhas possuem de 2 a 8 canais resiníferos internos, e raramente de apenas 1 mediano. Apresenta-se com hipoderme biforme, espessa com 3 a 5 camadas de células, e com bainha de 10 a 12 mm de largura, marrom clara, tornando-se gradativamente escura e persistente. As "flores" são estrobiliformes, alojando-se as femininas em maior percentagem, na parte superior da copa, enquanto que as masculinas, se concentram em maior quantidade na parte basal da mesma, sendo portanto diclina. A polinização é predominantemente alógama e anemófila.

Segundo FARJON (1984), os cones quando jovens, são eretos e reflexos, com pedúnculos, escamosos, com 1,0 a 1,5 cm de largura, elipsóides, brilhantes e com apêndices pequenos. Quando maduros, são geralmente reflexos, simétricos, decíduos, com 6,0 a 14,0 cm de comprimento.

MIROV (1967) diz que as sementes desta variedade são ovóides, mais largas em uma das extremidades, pontiagudas em ambos os extremos, triangulares, ligeiramente grossas e coloridas, com asas articuladas membranosas e de fácil remoção mecânica (Figura 1). Internamente, protegendo o embrião encontra-se o tecido nutritivo do gametófito feminino (nucelo) e a seguir o integumento, como "casca" protetora da semente. A dispersão é anemocórica.

Segundo este mesmo autor, não existem problemas de germinação das sementes quando as condições são favoráveis, e não apresenta "grass stage". Após o início da germinação, as raízes primárias principiam seu crescimento em direção ao solo. Há o alongamento do hipocótilo, os cotilédones saem para fora do solo, envoltos pela "casca" da semente e com o endosperma parcialmente absorvido. Em poucos dias, os cotilédones se liberam e estendem suas folhas, tornam-se verdes, e como já possuem estômatos, são capazes de fotossintetizar. Nesta variedade, o número de cotilédones varia de 5 a 9, sendo mais comum 7 a 8. O hipocótilo, entretanto é freqüentemente de cor avermelhada, causada pela presença de uma antocianina, malvidina, que esporadicamente aparece nos cotilédones. Após 15 dias da germinação, os cotilédones atingem seu tamanho máximo e, logo acima deles aparece um feixe de folhas primárias, que assume a função de folhas fotossintetizantes (Figura 2).

Figura 1. Estrutura interna das sementes de duas espécies de *Pinus* sp. Esquerda: *P. lambertiana* A e B, vista geral em 2 planos; C, secção longitudinal (a, testa, b, nucelo; c, endosperma; d, saco embrionário; e, cotilédono; f, plúmula; g, radícula; h, suspensor; i, micrópila; j, hipocótilo); D, embrião. Direita: *P. ponderosa*, vista externa da semente, com fragmento de asa; B e C, vista exterior da semente em 2 planos; D, secção longitudinal; E, secção transversal. (MIROV, 1967).

Figura 2. Plântulas de *P. edulis* em diferentes estádios evolutivos - A, plântulas recém-germinadas, mostrando os cotilédones envoltos na "capa" da semente; B, plântulas mais velhas, mostrando os cotilédones e as folhas primárias espiralmente arranjadas, bem como a disposição dos cotilédones. (FOSTER & GIFFORD, 1959).

Segundo MIROV (1967), as folhas secundárias, normalmente denominadas de acículas, podem aparecer ocasionalmente no final da primeira estação de crescimento mas, em geral, acontece no decorrer do segundo ano. As folhas primárias, em relação às secundárias são sempre irregulares na sua aparência. Dentro de 2 ou 3 anos, as folhas primárias são completamente substituídas pelas secundárias.

Segundo LAMB (1973) e FARJON (1984), os representantes arbóreos quando adultos, alcançam até 45 m de altura, tronco normalmente reto, que pode chegar a 1,35 m de diâmetro à altura do peito. Os ramos são retos e ascendentes, formando geralmente uma copa densa e estreita. A casca nas árvores jovens é delgada, sulcada e cor gris, e nas adultas se torna fissurada, em placas retangulares achatadas e esfoliativas, e de cor escura.

2.1.2.3. Importância econômica

No Brasil, o *P. caribaea* Morelet pode ser considerado uma das espécies mais importantes, a partir da qual vem se desenvolvendo todo um programa de melhoramento florestal e conservação genética (KAGEYAMA, 1980; SILVA et alii, 1983; SANTOS et alii, 1988) em paralelo às atividades econômicas de produção (BARRICHELO, 1980; BRITO & BARRICHELO, 1982). Segundo estes autores, a madeira desta variedade é de boa qua

lidade e empregada para produção de polpa de celulose de fibra longa para papel, para indústria de construção civil (caixilhos, forros), para as indústrias moveleiras, para a indústria química (resina e derivados), para a produção de carvão vegetal, além do uso para proteção dos solos.

2.2. CLONAGEM DE ESPÉCIES ARBÓREAS VIA CULTURA DE CÉLULAS E TECIDOS

2.2.1. Histórico e fundamentos

Para introdução no contexto em estudo, é oportuna a definição clara e simples dada por GROUT & SHORT (1979), quando dizem que a cultura de tecido vegetal é uma técnica através da qual pequenos pedaços da planta selecionada, denominados de explantes, são cultivados em meio artificial, cientificamente definido, contendo os nutrientes orgânicos e inorgânicos necessários ao crescimento e desenvolvimento vegetal, sob condições assépticas. Esta técnica se baseia na totipotência ou competência celular, que é a capacidade que as células possuem de regenerar a planta inteira.

As árvores são organismos multicelulares, de tecidos estrutural e funcionalmente complexos. Suas células exibem considerável variação em tamanho, forma e capacidade funcional, mascarando o fato de que todas estas células pos-

suem uma origem comum - células, ovo ou zigoto. As subsequentes divisões mitóticas deste zigoto, produzem um embrião na semente, que ao completar seu desenvolvimento é dotado de um ápice caulinar e radicular diferenciados.

Segundo estes mesmos autores, as divisões celulares dentro destas regiões especializadas produziram as células necessárias para a reprodução da planta inteira e funcional. Fica assim evidente, que a original célula única do zigoto contém toda informação requerida para a produção de uma planta completa. Esta informação está contida no DNA cromossômico dos núcleos celulares, e cópias precisas dela, foram transmitidas para as células filhas durante a divisão celular mitótica. Assim, como cada célula vegetativa da planta adulta foi efetivamente derivada por mitoses de células do embrião jovem, é evidente que cada uma destas células contém toda a informação necessária ao crescimento e desenvolvimento do organismo completo. Esta capacidade impressora de células que é conhecida como **totipotência**.

Este conceito, já era de preocupação do botânico alemão Harbelandt⁸, citado por GROUT & SHORT (1979), quando afirmava que faltavam pesquisas sistematicamente organizadas para o cultivo de células vegetais de organismos arbóreos em solução nutritiva simples. Dizia ainda que os resultados

⁸ HABERLANDT, G. Beitr. Allgem. Bot., 2: 1-53, 1921.

de tais experimentos forneceriam informações sobre as propriedades e potencialidades da célula como uma unidade elementar, além das informações sobre as interrelações e influências complementares, quando no interior de um organismo multicelular.

Após 69 anos da questão anterior, pesquisadores formularam várias hipóteses para explicar as causas da diferenciação celular. Segundo Clowes⁹, citado por BANDEL (1979), a diferenciação celular depende da atividade do núcleo e do citoplasma e ressalta a importância de 5 itens relacionados ao processo de diferenciação: **a)** é o citoplasma que define se o núcleo deve sintetizar DNA ou RNA, se a célula deve se dividir ou se diferenciar; **b)** existe variação não sistemática entre as células quanto ao número de organelas. Às vezes, o aumento do número de organelas é diretamente proporcional ao aumento do citoplasma celular; **c)** existem diferenças no desenvolvimento das organelas, em qualidade, tamanho e número; **d)** existem diferenças na posição ocupada pelas organelas no interior celular; **e)** acredita-se ainda, haver modificações na estrutura da parede celular, pois sabe-se que os constituintes das paredes são sintetizados principalmente no complexo de Golgi, microtúbulos e no retículo endoplasmático. A atividade e posição destas organelas podem ser fatores de diferenciação celular.

⁹ CLOWES, F.A.L. Cells organelles and the differentiation of somatic plant cells. In: REINERT & URSPRUNG. Origin and continuity of cell organelles, 1971. p.323-39.

BANDEL (1979), diz que o zigoto possui organelas citoplasmáticas, oriundas dos gametas femininos e masculino que lhe originou. O gameta feminino sendo muito maior que o masculino, é natural que este contribua com a maior parte dos constituintes do zigoto.

Segundo WILLIAN (1985), os óvulos de gimnospermas apresentam um tegumento protetor, que abriga em seu interior o núcleo. Divisões celulares meióticas, seguidas de divisões mitóticas, dão origem a um tecido haplóide multicelular - o gametófito feminino, que no final da micrópila é diferenciado em um ou mais arquegônios da célula ovo. Na fertilização, o tubo polínico libera 2 ou mais núcleos no arquegônio, sendo que um dos quais, se unem com o núcleo da célula ovo (megasporângio). Embora mais que um arquegônio possa ser fertilizado dentro de um único óvulo, apenas um embrião por semente se desenvolve até a maturidade. Mesmo que a poliembrião possa ocorrer, ela é rara no gênero *Pinus*. Na maioria das espécies vegetais, as organelas citoplasmáticas do gameta masculino se degeneram no momento da formação do zigoto.

Este mesmo autor diz que, as condições nutricionais para o crescimento e diferenciação do zigoto a um embrião não estão presentes no momento da fertilização, porque o tecido que supre o crescimento do embrião, forma-se após a fertilização. O segundo núcleo masculino é abortado em *Pinus*. O núcleo é o componente celular mais importante do zigoto. Há

a formação de duas células parecidas que vão se diferenciando através das divisões mitóticas subseqüentes, em célula do embrião - que se divide várias vezes; e a do suspensor, que aumenta seu volume e não se divide.

A existência de um gradiente no interior celular é importante para o processo de diferenciação. Jensen¹⁰, citado por BANDEL (1979), mostrou que as divisões mitóticas do zigoto são diferentes quanto a sua constituição citoplasmática: a célula mais próxima da micrópila apresenta menor número de plastos, tamanho menor de mitocôndrios e menos RNA do que a sua célula-irmã. Stebbins¹¹, também citado por este mesmo autor, acredita ainda que o efeito diferencial seja causado por variação no fluxo dos hormônios, oriundos da atividade de células meristemáticas ou originários de um mecanismo ainda desconhecido de permeabilidade seletiva, e que, o destino da célula esteja condicionado ao seu estado de maturidade (ativação e repressão dos genes) no momento em que ela é submetida a essas condições.

Segundo estes autores, toda espécie vegetal (ou animal) tem grande número de genes, mas que em determinado momento da vida do organismo, poucos genes estão realmente ati-

¹⁰ JENSEN, W.A. The ultrastructure of the egg and central cell of cotton. Amer. J. Botany, 52: 781-97, 1965.

¹¹ STEBBINS, G.L. Polarity gradients and the development of cell patterns. In: CUTTER, Trands in plant morphogenesis. London, Longmans, 1966. p.115-39.

vados e esta inativação dos genes é causada por repressores que são citoplasmáticos. Estudos evidenciaram que são iguais a quantidade de DNA em todas as células de um organismo, compreendendo-se que o papel do núcleo na diferenciação não resultaria da perda ou ganho do material genético, mas da sua ativação e inativação, embora a poliploidia, politenia e amplificação gênica se constituam em exceção à constância do DNA.

A célula do suspensor, segundo WILLIAN (1985), tem função diferenciada, ou seja, a de reserva e armazenamento de substâncias necessárias ao desenvolvimento do embrião, enquanto que, a função da célula embrionária é dividir-se, originando as células do embrião e dos meristemas apicais. As células dos tecidos vão se diferenciando, à proporção em que o embrião, cotilédones e integumento se desenvolvem para a formação da semente.

As sementes maduras, segundo este mesmo autor, consistem nas seguintes partes: a) testa da semente - desenvolvida do integumento diplóide do pai feminino; b) perisperma diplóide - desenvolvido no núcleo celular, que muitas vezes é absorvido pelo gametófito feminino e desaparece pelo tempo que a semente amadurece; e c) o embrião, com a radícula, hipocótilo, plúmula e cotilédones que variam em número entre e dentro do gênero, chegando até 18 em alguns *Pinus*.

Isto posto, fica claro que toda e qualquer par

te do tecido vegetal, tem condições de se desenvolver e regenerar a plântula inteira, se determinados estímulos lhes forem fornecidos. Para tanto, tecidos de raiz, caule, folha, câmbio, cotilédones, endosperma, eixo embrionário, pólen, óvulos, têm sido empregados para iniciar a cultura "in vitro".

Para GEORGE & SHERRINGTON (1984), vários são os fatores que influenciam o crescimento e diferenciação dos tecidos na cultura "in vitro": **genótipo** - constituição genética do material cultivado; **substrato** - que fornece os elementos necessários à sobrevivência e desenvolvimento, e através do qual os estímulos são fornecidos ao explante; **ambiente** - condições ambientais sobre a qual a cultura é desenvolvida e; os **fatores dependentes do tecido** - idade, fase do crescimento, condições fisiológicas e origem.

Segundo estes mesmos autores, o tecido explantado pode apresentar os seguintes tipo de crescimento "in vitro": **crescimento organizado** - que ocorre quando partes vegetais organizadas, tais como meristema apical de brotos ou raízes, folhas iniciais, gemas florais jovens, embriões e pequenos frutos são transferidos para a cultura e pode continuar a crescer com sua estrutura preservada, ou quando tais estruturas são neo-formadas durante o processo de cultivo. Este processo de "nova" formação é denominado de organogênese ou morfogênese; **crescimento não organizado** - calo, que normalmente não é encontrado na natureza, ocorrendo quando pedaços da planta são cultivados assépticamente. Ao tecido formado,

de estrutura atípica, se constituindo de agregados de células, e possuidores de um número limitado da maioria das células especializadas, que são geralmente encontradas em uma planta completa.

Segundo BONGA (1982) e GEORGE & SHERRINGTON (1984), os seguintes tipos de culturas são realizados: cultura de calos, de protoplastos e de órgãos. Pelo processo de cultura de órgãos, geralmente são efetuadas as culturas de antera, pólen, ápice caulinar, nódulos e de embrião. A escolha do tipo de cultura a ser empregada, dependerá da resposta desejada, do explante aplicado e das facilidades operacionais de trabalho. Normalmente na clonagem "in vitro", são empregados a cultura de calo e cultura de órgãos, embora os demais also também o sejam, porém em menor frequência.

A cultura de calo, segundo BONGA (1982), DODDS & ROBERTS (1982), GAMBORG (1982) e GEORGE & SHERRINGTON (1984), pode ser iniciada de qualquer tipo de material explantado, possuidores de células parenquimatosas, capazes de recomeçar o processo de divisão celular e formar uma massa não organizada de células proliferativas. De tais culturas, tenta-se manipular o ambiente (nutricional e físico) e induzir, a diferenciação em raízes ou brotos, seguidos de alongamentos, ou permitir que crêscam sem organização. Na prática, induz-se o calo a organizar-se em gemas e desenvolver-se em brotos e, seqüencialmente, faz-se a transferência dos brotos excisados para os meios possuidores de substâncias promotoras do enraiza-

mento. de forma a constituírem em uma nova "plântula". Embora, "plântulas" tenham sido produzidas freqüentemente de cultura de calo, a aplicação operacional da mesma é restrita às espécies que ofereçam facilidades para o processo de diferenciação em gemas, desenvolvimento e enraizamento.

Desta forma, pesquisas foram intensificadas nesta década, visando explorar a potencialidade desta técnica em essências florestais, para multiplicação de plântulas de genótipo conhecido, além da obtenção e multiplicação de mutantes, através da variação somaclonal.

A cultura de órgão - segundo BONGA (1982), vários tipos de cultura de órgãos têm sido usados, para estudar a organogênese e formação de "plântulas" de essências arbóreas, empregando como explantes pedaços de folhas, cotilédones, hipocótilos, porções de embriões, estruturas reprodutivas, gemas e meristemas apicais.

Cada tipo de planta tem uma constituição genética característica - o genótipo, e este conjunto de informação contido nos genes, é tipicamente carregado por todos os constituintes celulares. Segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984), os diferentes seguimentos e órgãos empregados como explantes para iniciar a cultura "in vitro", apresentam um padrão de crescimento que depende do tipo de estrutura que possuem, e do tipo de "pré-determinação" genética que as células já possam ter recebido. Todos os genes não são atuantes simultanea

mente nos tecidos; alguns genes podem se expressar continuamente, mas outros apenas em ocasiões específicas. A expressão dos genes é regulada pelo meio ambiente em que as células se encontram. Mudanças na regulação da expressão dos genes que perduram por longo período, mesmo após a remoção das substâncias promotoras, e que são transmitidas para outra célula, são denominadas de "epigenética". As mudanças que ocorrem apenas temporariamente em resposta aos estímulos, e desaparecem quando os mesmos são removidos, são denominadas de "fisiológica".

Os autores citados anteriormente, dizem que, a determinação é um fenômeno epigenético, e de acordo com os órgãos vegetais empregados como explantes na micropropagação, eles podem ser de dois tipos: **órgãos de crescimento determinados**, que são os destinados a terem apenas um tamanho e forma (folhas, flores e frutos); e **órgãos de crescimento indeterminados**, onde o crescimento é potencialmente ilimitado (meristemas apicais de raízes e brotos).

2.2.2. Aspectos da cultura de tecido em coníferas com especial atenção para as espécies do gênero *Pinus*

Segundo MURASHIGE (1974), tem sido reconhecido que, este processo de micropropagação "in vitro", deve ser

realizado através de uma seqüência de passos, claramente identificados, cada um com diferentes objetivos e necessidades. Basicamente os 3 estágios referidos são: **primeiro** - objetiva a obtenção de uma cultura de tecido asséptica, com boa proporção de explantes sobreviventes na mesma; **segundo** - objetiva ao crescimento do órgão inoculado e promoção de condições favoráveis ao aparecimento de outras estruturas (morfogênese) e que possam se desenvolverem em "plântulas"; **terceiro** - que envolve ao enraizamento dos brotos, rustificação das "plântulas", e conversão das mesmas do estado heterotrófico para o autotrófico.

Em resumo, os aspectos considerados nos diferentes estágios da cultura "in vitro" são: a escolha e/ou adaptação dos constituintes do meio de cultura, a escolha do explante, das condições ambientais de cultivo, o período de exposição à determinado fator e a interação entre estes aspectos.

2.2.2.1. Meio de cultura

A qualidade do meio de cultura usado, através da natureza de seus componentes e do balanço entre estes, é que fornece determinados estímulos às plantas, com ela interagindo e induzindo à ocorrência de eventos dirigidos. Os explantes podem ser cultivados tanto em meio líquido quanto em meio semi-sólido.

O meio semi-sólido é amplamente usado para o início ou estabelecimento da cultura de calo ou de órgãos e para manutenção das culturas por longo período. O ágar é ainda o agente solidificante mais comumente empregado.

a) Ágar

Para BONGA (1982), as culturas em suspensões são freqüentemente preferidas sobre culturas em ágar ou semi-sólida, embora existam tecidos que são morfogeneticamente ativos, apresentando resultados satisfatórios em meio com ágar. As razões desta diferença de comportamento não estão claras, mas suspeita-se de: 1) perda de componentes químicos vitais à célula pela osmose, pode ser mais severa em meio líquido; 2) paralelamente ao fornecimento de um suporte sólido para o tecido, podendo ser benéfico, ele tem capacidade adsorbtiva como o carvão e pode remover algum produto residual da célula; células em meio de agitação, estão sujeitas a danos mecânicos.

Segundo este mesmo autor, uma das vantagens das culturas em meio semi-sólido é que não requerem os agitadores caros, embora sendo um produto natural, e dependendo do grau de purificação do ágar pode-se esperar diferenças nas respostas ao crescimento das culturas, pois devido à diversidade de aplicação; ágar de boa qualidade é muitas vezes difícil de se obter. Outro problema com o ágar, é que ele é fonte de muitos minerais, e em particular do sódio, e provavelmente de

algumas vitaminas e toxinas que podem interferir nos estudos metabólicos e nutricionais. Muitas substâncias têm sido pesquisadas em substituição ao ágar, mas não têm sido aceitas. A concentração do ágar em meio semi-sólido influencia a morfogênese, bem como a taxa de crescimento do calo.

O meio líquido é naturalmente essencial para cultura em suspensão, mas tem sido preferido para experimentos específicos de nutrição, crescimento e diferenciação de calos de tecidos, como também em trabalhos de micropropagação (BONGA, 1982). Para este tipo de cultura, há necessidade de um tipo de suporte para amparar os explantes de pequeno tamanho, acima da superfície líquida, pois do contrário, morrerão devido a falta de aeração. Órgãos maiores, em geral, se desenvolvem de forma satisfatória numa camada da superfície líquida não agitada, embora muitos tecidos e órgãos, pequenos e grandes, cresçam bem em meio líquido sem suportes, mas providos de agitadores mecânicos. A agitação propicia o aumento da aeração, a redução da polaridade vegetal, a distribuição uniforme dos nutrientes e a diluição dos exudatos tóxicos dos explantes.

b) Nutrientes minerais

Soluções salinas desenvolvidas para culturas hidropônicas de plantas inteiras foram freqüentemente usadas como base, para a composição dos nutrientes minerais dos pri-

meios feitos para a cultura do tecido vegetal. Segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984), as duas soluções, a de Knop¹² e Pfeffer¹³, foram originariamente definidas pela proporção entre os pesos dos sais usados, conduzindo à necessidade de definição dos pesos dos compostos necessários ao emprego em meio de cultura de tecido vegetal, resultando em muitas variações nas composições iniciais.

Segundo MURASHIGE (1974) e GEORGE & SHERRINGTON (1984), para o crescimento saudável e vigoroso do explante é necessário grande quantidade de íons inorgânicos (sais de nitrogênio, potássio, cálcio, fósforo, magnésio e enxofre) e pequenas quantidades de outros íons ou elementos traço (sais de ferro, manganês, zinco, boro, cobre, molibidênio e cobalto). Os sais atualmente usados são os da fórmula de MURASHIGE & SKOOG (1962) e de suas variações para o cultivo de numerosas espécies de plantas e órgãos e na busca dos objetivos mais diversos.

Além de fornecer macro e micronutrientes necessários ao vegetal, o meio de cultura deverá conter também um carboidrato, normalmente a sacarose a uma concentração de 2 a 3%. Melhores resultados foram conseguidos, segundo estes mes

¹² KNOP, W. Landwirtsch. Vers. Stn., 7: 93-107, 1865.

¹³ PFEFFER, W. The physiology of plants 1. EWART, A.J. (ed. e trad.). Oxford, University Press, 1900.

mos autores, quando ao substrato de crescimento foi adicionado pequenas quantidades de certos componentes orgânicos, principalmente as vitaminas, aminoácidos, tampões, e reguladores de crescimento, permitindo assim que houvesse contínuo crescimento dos explantes inoculados.

c) Reguladores de crescimento

Segundo FELIPPE (1979) e CASTRO (1985), os reguladores de crescimento vegetais são compostos orgânicos, não nutrientes, que em pequenas quantidades promovem, modificam ou inibem processos fisiológicos. Quando estas substâncias são produzidas pelas plantas, sendo portanto de natureza endógena, recebem a denominação de hormônios vegetais ou fitohormônios, com ação geralmente em local diferente ao da sua síntese.

Estas substâncias reguladoras de crescimento, podem também serem sintetizadas em laboratórios, e quando aplicadas aos vegetais produzem efeitos semelhantes aos dos hormônios naturais, recebendo portanto a denominação de fitoreguladores. Os hormônios naturais (fitohormônios) e os sintéticos (fitoreguladores), são substâncias reguladoras de crescimento e classificados em: auxinas, giberilinas, citocininas, etileno e ácido abscísico.

Segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984), a auxina

foi descoberta por volta de 1934, enquanto que as giberelinas e as citocininas o foram na década de 50, e os inibidores de natureza fenólica em 1965. Os reguladores de crescimento apresentam as seguintes características em comum:

- a) agem em baixa dosagem;
- b) o efeito tóxico em altas dosagens permitem que alguns sejam usados como herbicidas;
- c) só agem em interação com outros reguladores, cuja ação é determinada pelo equilíbrio entre eles;
- d) de interferência múltipla nos fenômenos fisiológicos celulares resultando no abandono do conceito hormonal de natureza específica;
- e) os reguladores sintéticos persistem durante um período mais longo, e os endógenos são facilmente controlados ou eliminados pelo metabolismo celular.

Segundo JACOBSEN (1983), a utilidade dos reguladores de crescimento vegetais depende da: concentração e estabilidade no meio de cultura durante a preparação, esterilização e período de cultivo e, da rapidez na translocação e metabolismo nos tecidos durante a cultura. Nas pesquisas com cultura de tecidos vegetais, os relatos são contrastantes sobre os efeitos dos reguladores de natureza similar em tecidos de mesma qualidade, pois esperar-se-ia que reguladores pertinentes à mesma classificação agissem sempre da mesma forma em

tecidos idênticos, embora experiências práticas mostram que isto, não é necessariamente o que acontece. Geralmente os reguladores vegetais de natureza sintéticas, apresentam estabilidade maior, em cultura de tecidos, que os hormônios naturais.

c.1. As auxinas

As auxinas são substâncias químicas relacionadas com o ácido indolil-3-acético (AIA), de ocorrência natural nos vegetais, principalmente em órgãos que estão em crescimento ativo (regiões meristemáticas, folhas jovens, coleoptilis e sementes), e que causam o crescimento por alongamento celular (VALIO, 1979).

Os estudos sobre o metabolismo das auxinas têm-se concentrado quase que exclusivamente no AIA, devido às provas de que é a principal auxina das plantas, embora outros compostos indólicos (indolil-3-acetonitrila, ácido indolil-3-pirúvico e indolil-3-acetaldeído) também sejam naturalmente encontrados.

Quanto ao mecanismo de ação das auxinas, no processo de alongamento celular, CASTRO (1985), considera que as auxinas atuam na síntese de RNA mensageiro, induzindo a formação de enzimas ou ativando enzimas pré-formadas, que atuam rompendo as ligações entre as microfibrilas de celulose

da parede celular. Este rompimento promoveria aumento na plasticidade, deformação irreversível da parede celular, causando diminuição do coeficiente de reflexão e na pressão potencial, acarretando o influxo de água e conseqüente aumento nas dimensões celulares devido ao baixo potencial osmótico no interior do vacúolo.

Além do efeito já exposto, ZAERR & MAPES (1982) dizem que as auxinas podem também induzir a dominância apical, estimular a formação de raízes adventícias em estaca, reduzir a abscisão das folhas e frutos, induzir a formação de calos em feridas externas, afetar a formação do xilema, crescimento das gemas vegetativas, germinação e outros processos morfo-fisiológicos, reafirmados por JACOBSEN (1983) ao observar a maior concentração das auxinas nos brotos que nas raízes, durante o processo de alongação celular, acarretando um crescimento desorganizado, inibição da formação do embrião (em cultura de células em suspensão), irregularidades mitóticas na cultura de tecido e formação de frutos partenocarpicos em algumas espécies. Foi constatado também, a indução de síntese de DNA, pelo 2,4-D durante o processo de indução de calo, confirmando suspeitas da existência de proteínas como fatores intermediários na interação dos hormônios com o genoma.

VALIO (1979), diz existirem vários indícios que sugerem que o aminoácido triptofano (substância química semelhante ao AIA) de ocorrência geral em todas as células vivas

vegetais, seja o precursor do mesmo, e que o zinco seja necessário no seu processo de síntese.

Segundo este mesmo autor, o AIA não é apenas sintetizado nas plantas, mas também inativado durante os processos de crescimento e diferenciação, sendo de alta concentração nos locais de síntese e regiões de crescimento ativo e de níveis reduzidos em tecidos adultos, já diferenciados. A inativação do AIA nos tecidos vegetais, é causada por processos fitoquímicos ou enzimáticos que degradam a molécula de AIA ou a coligam com outras moléculas, produzindo compostos geralmente inativos.

São compostos sintéticos como 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenoacético (ANA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, ácido 2,4,5-triclorofenoxipropiônico e ácido 3-clorofenoxipropiônico-3-cp, que em sistemas de cultura de tecidos produzem resultados similares ao AIA, embora sejam mais preferidos que este, por serem mais estáveis e efetivos.

Nas culturas de tecidos vegetais as auxinas são freqüentemente usadas para induzir a formação de calos, contrário ao evidenciado pelo trabalho de Gautheret¹⁴, citado por ZAERR & MAPES (1982) que trabalhando com várias espécies arbóreas florestais observou que a auxina não era essencial para

¹⁴ GAUTHERET, R.J. La culture des tissus végétaux. Paris, Masson et Cie., 1959.

estas culturas, embora os grandes segmentos de plantas empregados pelo autor como explantes poderiam conter auxina endógena em quantidade suficiente, dispensando o suprimento exógeno, conduzindo-o a tal observação.

A auxina estimula a formação de calos, mas concentração ideal é variável de acordo com a qualidade do explante trabalhado. Segundo VALIO (1979), os níveis endógenos de AIA nas plantas são controlados por variações nas velocidades de síntese, destruição e inativação. Esta variação nas velocidades de síntese é influenciada por fatores do meio ambiente e pela idade fisiológica da planta ou do órgão. Em tecidos clorofilados a síntese de auxina é maior na luz que no escuro; folhas e frutos também apresentam variações no nível endógeno de AIA durante o seu desenvolvimento, além das variações encontradas nas plantas perenes de regiões temperadas, onde os níveis de auxina variam com as estações do ano, ocorrendo em maiores concentrações durante a primavera e verão e em menores durante o outono e inverno.

Desta forma, segundo ZAERR & MAPES (1982), as concentrações endógenas deste hormônio, às quais as células estão submetidas, são raramente conhecidas, embora sejam frequentes os relatos sobre seu efeito indutor de brotos em várias coníferas e folhosas, raízes em *Pinus lambertiana* (GREENWOOD et alii, 1974), raízes e brotos em *P. silvestre* e *P. lambertiana*, e novo xilema foi estimulado em *P. silvestre*, embora também existam relatos sobre seu efeito inibitório na indu

ção de gemas em acículas de *Picea abies*, na formação de estróbilo masculino em explantes de *Thuja plicata* e da produção de brotos em cultura de calos de *Populus tremula* sem qualquer aplicação exógena de auxina. Estes exemplos apenas evidenciam a existência endógena da auxina no tecido explantado, cuja quantidade pode ser suficiente para promover os eventos relatados.

O ácido indol-3-butírico (IBA), tem sido empregado como substituto ao AIA, mais estável, de efeito similar ou superior ao mesmo e resistente à oxidação. Está parcialmente associado ao efeito de enraizamento, embora tenha promovido a indução de gemas em *Pinus silvestre*. BORMAN & JANSSEN (1980), observaram que o IBA produzia calos marrons em *Picea abies*, enquanto o AIA produzia calos verdes claros, sugerindo restrições nos processos substitutivos dos produtos. Esta diferença pode, segundo ZAERR & MAPES (1982) ser devida a maior taxa de destruição do AIA por enzimas oxidativas, resultando em diferentes concentrações dos hormônios nos tecidos.

Segundo os autores citados acima, o ácido nafenaleno-acético (ANA), também tem sido amplamente empregado em culturas de tecido em substituição ao AIA. Ambos, o IBA e o ANA, porém de maneiras diversas, diferem ligeiramente do AIA, e embora suas formas de ação sejam similares o ANA apresenta maior estabilidade, sendo por isto o mais usado no processo de substituição. O ANA, tem sido amplamente empregado para induzir calos, tanto em gimnospermas com em angiospermas, se

constituindo para este objetivo, na substância disponível mais adequada. Tem freqüentemente promovido a indução de raízes em calos e em embriões, embora, a sua remoção do meio de cultura para certos casos, tenha resultado na indução de raízes. Em algumas coníferas, como o *Pinus radiata*, tem promovido ao aparecimento de brotos e inibido a formação de raízes em explantes cotiledonares de *Pseudotsuga menziesii*.

Ácido 2,4-diclorofenoxiacético - usado normalmente como herbicida, hoje é aplicado para proliferar células, provocando a desdiferenciação e crescimento desorganizado (calo). São poucos os relatos do uso de 2,4-D como promotor da organogênese. Apresenta resultados dos mais variados quando aplicado em essências florestais, desde indução de brotos em explantes cotiledonares de *Pseudotsuga menziesii* até incentivar a formação de raízes em cultura de células em suspensão de *Pinus gerardiana*, mas que segundo KONAR (1975) esta espécie apresentava inibição à rizogênese quando em meios sólidos. Muito embora, seu papel como substância de desdiferenciação esteja claramente estabelecido em culturas "in vitro", sabe-se muito pouco sobre o seu modo de ação, e embora classificado como auxina, não pode ser usado como substituto da mesma (STREET & WITHERS, 1974).

Vários outros compostos, possuidores de propriedades similares ao AIA têm sido testados em sistemas de cultura de tecidos vegetais. O ácido indolpropiónico (IPA),

segundo KONAR (1975), estimulou a iniciação de raízes em *Pinus gerardiana* e em *Tectona grandis*, segundo GUPTA et alii (1980), embora HARVEY et alii (1971) revelassem que ele não tinha modificado o crescimento dos tecidos do *Pinus monticola*.

WINTON & VERHAGEN (1977), experimentando a aplicação do ácido naftoxiacético (NOA) em *Pseudotsuga menziesii* acreditaram promover crescimento de brotos em calos desta espécie e, crescimento de brotos em explantes de *Santalum album*, embora acreditassem inibir ao desenvolvimento das gemas excisadas de *Picea glauca*.

Relatos sobre a ação do ácido 2,3,6, tricloro-benzóico, que estimulou a formação de raízes em calos de *Populus tremuloides*, crescimento de calos em explantes de *Santalum album*, além da estimulação do desenvolvimento em brotos de gemas excisadas de *Pseudotsuga taxifolia* pelo ácido 2,6 - D e ácido 2,3,5. triclorofenoxiacético, entre outros produtos de aplicação e resultados controvertidos, sugerindo cautela quanto ao emprego dos mesmos, até que maiores conhecimentos sejam adquiridos sobre sua ação nos processos morfogênicos.

c.2. As citocininas

Segundo METIVIER (1979), as citocininas são substâncias derivadas da purina adenina, base nitrogenada das

moléculas dos ácidos nucleicos, DNA e RNA. As citocininas promovem a divisão celular, o aumento do tamanho da célula, quebra a dormência das sementes, inibe a dominância apical estimulando o desenvolvimento dos brotos laterais e retarda o envelhecimento de alguns tecidos. A hipótese mais aceita sobre o mecanismo de ação da citocinina é que elas agem diretamente sobre as enzimas e apresentam maior atuação na atividade enzimática do que no seu processo de síntese.

Este mecanismo de ação é influenciado por variáveis estruturais do próprio hormônio. CASTRO (1985), diz que a citocinina IPA, N⁶ (2- isopentonil adenosina) promove a ligação do RNA transportador ao complexo ribossômico-mensageiro e acredita na importância de sua presença na formação e função de diversos RNA transportadores, controlando assim a síntese protéica.

A primeira citocinina descoberta foi em 1954 e de natureza sintética, isoladas de DNA autoclavado de esperma de arenque, recebendo a denominação de cinetina. Por ter sido extraída de ácido nucleico, acreditavam ser ela um derivado de purina que por hidrólise produziria adenina. METIVIER (1979), diz ainda que após o isolamento da cinetina, grande número de citocininas sintéticas foram produzidas pela modificação na cadeia lateral, na posição N-6 da base adenina.

A primeira citocinina natural em plantas foi extraída de grãos de milho em 1963, recebendo a denominação

de zeatina. Esta substância de origem natural, é muito mais ativa que a cinetina, ocorrendo como uma base livre e também como um nucleosídeo e nucleotídeo, encontradas nas mais diversas espécies de vegetais (METIVIER, 1979). As principais regiões de síntese das citocininas são os meristemas radiculares, podendo entretanto, serem sintetizadas nas partes aéreas. Através do xilema, elas translocam-se livremente para todas partes da planta.

Em culturas de tecidos de *Pseudotsuga menziesii*, há relatos da duplicação do volume celular, ausência de calogênese em *Pinus banksiana*, inibição do crescimento de tumores em *Picea glauca*, pouco efeito no crescimento do novo xilema em *Pinus silvestris*, indução de gemas em *Pinus contorta*, *Pinus taeda* e *Santalum album*.

Nos processos morfogênicos, o balanço hormonal entre as auxinas e as citocininas, tem revelado ser o responsável pela ocorrência de calogênese e rizogênese quando há a predominância da auxina em relação a citocinina, e quando o inverso acontece, dá-se a formação de brotos.

As citocininas sintéticas, geralmente empregadas em culturas de tecidos (MURASHIGE, 1974) são: a cinetina-6-furfurilaminopurina, BAP ou BA-6-benzilaminopurina e o 2 ip (N-6-(3 dimetilamilanina purina). Para METIVIER (1979), é importante ressaltar que a aplicação exógena pode dar resultados enganadores no processo de cultura "in vitro", pois as subs-

tâncias aplicadas exogenamente podem interferir com o metabolismo normal de qualquer molécula semelhante a elas, ou então ser transformadas dentro da célula em um outro produto.

c.3. As giberelinas

Formam outra classe de hormônios de crescimento, exercendo forte controle no mecanismo de alongamento celular e respostas ao florescimento. Acredita-se que a ação seja exercida na membrana celular. Sua ação foi observada primeiramente em 1926 em plantas de arroz, embora somente em 1939, tenha sido identificado o GA₃-ácido giberélico. É possível que estudos estejam sendo realizados para a produção das giberelinas sintéticas, embora pela complexidade estrutural de suas moléculas, os resultados não sejam alentadores. As giberelinas são substâncias que podem: **a)** agir sobre alongamento dos entrenós; **b)** ser útil para cultura de meristemas; **c)** ser estimulador do metabolismo, favorecendo a síntese de enzima hidrolisante, e da auxina; **d)** ter ação da floração e atuação nos efeitos de quebra de dormência. Nos processos morfogênicos encontrou-se que o ácido giberélico induziu embriões em calos de *Santalum album* e estimulou o crescimento de calos em *Cupressus junckia*. E na natureza são encontradas nas folhas, caules, raízes, sementes e embriões, sua região de síntese coincide com as áreas meristemáticas (METIVIER, 1979).

c.4. Inibidores

Segundo ZAERR & MAPES (1982), existe uma variedade de compostos que não pertencem claramente a qualquer uma das categorias discutidas até aqui. Têm efeitos na regulação do crescimento ou morfogênese, embora de maneira contraditória. Inibem a manifestação morfogênética em alguns experimentos e promovem a realização em outros. Dentre eles estão os compostos fenólicos e o ácido abscísico.

Foi na década de 40, segundo DIETRICH (1979), que os inibidores naturais de crescimento foram extraídos de material radicular, sendo denominado de ácido cinâmico, embora como compostos fenólicos e geralmente esterificados por açúcares, eles sejam encontrados em vários órgãos vegetais. É de concentração variável no interior da planta, e dependente de diversos fatores ambientais, como a luz, infecção por microorganismos e ataque de insetos.

Os inibidores fenólicos e não fenólicos, segundo os autores citados anteriormente, apresentam as seguintes características: **a)** acumulam-se nos órgãos em que os efeitos são manifestados; **b)** não são degradados por tecidos em repouso; **c)** são ativamente sintetizados por tecidos verdes; **d)** deprimem a germinação e a abertura das gemas; **e)** deprimem o crescimento longitudinal em concentração mais baixa do que em outros tipos de crescimento. O de natureza fenólica, intervém ainda em numerosos outros processos, seja em antagonismo com

substância de crescimento, seja como inibidor de reações metabólicas, intervindo nos fenômenos de início de dormência das gemas ou das sementes. Na cultura "in vitro", estes compostos são às vezes liberados no meio e se oxidam, provocando injúria e muitas vezes a morte do explante.

c.5. Período de exposição ao fito-hormônio

Pesquisas realizadas por MOTT & AMERSON (1981) com embriões excisados evidenciaram o caminho alternativo para a cultura "in vitro" pela embriogênese somática. A produção de "plântulas" completas, por exposição alternadas ao estímulo dos fito-hormônios, possibilitou a produção de gemas.

Este conceito defende o fato que o desenvolvimento morfológico, é iniciado em uma cultura adequada através da adição de um regulador de crescimento e que, pouco tempo depois, a presença deste mesmo regulador pode inibir o desenvolvimento desejado. REILLY & BROWN (1976), já haviam observado este fenômeno com respeito a estimulação pela citocinina e a subsequente inibição da formação de gemas adventícias em *Pinus radiata*. Estes autores consideraram ser igualmente importante observar o fenômeno como extensão aos estádios subsequentes e, reunir informações suficientes para saber qual regulador aplicar para início da morfogênese, bem como quando removê-lo, para alcançar o desenvolvimento desejado. Esta

idéia da aplicação e remoção ponderada dos reguladores de crescimento pode ser denominada de "pulsing". Nesta metodologia há o reconhecimento de uma série de passos no desenvolvimento da cultura que permite observar o sinal transitório para o próximo estágio. Este conceito difere de numerosos relatos que defendem a existência de um conjunto de tratamentos específicos, e quando aplicados por períodos pré-determinados permitiriam, empiricamente alcançar a produção de "plântulas".

AMERSON et alii (1985) trabalhando com tecidos cotiledonares de embriões pré-germinados de *Pinus taeda*, seguindo o conceito de "pulsing" alcançaram o estágio de enraizamento e instalação no campo das "plântulas" desta espécie.

2.2.2.2. Fatores ambientais na cultura

a) A luz

De maneira geral, o crescimento de qualquer ser vivo depende da fotossíntese, processo através do qual, as plantas sintetizam compostos orgânicos, a partir de matéria-prima inorgânica, na presença da luz solar.

Segundo HALL & RAO (1978), o rendimento da fotossíntese das plantas depende de fatores internos e externos, tais como: a estrutura foliar e seu teor de clorofila; o acúmulo de produtos da fotossíntese dentro dos cloroplastos; a

influência de enzimas protoplasmáticas; a presença de pequenas quantidades de constituintes minerais; a qualidade e a quantidade de luz incidente no vegetal; a temperatura do ambiente e; as concentrações de dióxido de carbono e oxigênio na atmosfera que envolve a planta.

A luz pode afetar o processo morfogênico ou fotossintético pela sua intensidade, qualidade e duração ou fotoperíodo (STEIBERT et alii, 1985).

A intensidade luminosa é um dos principais fatores que governam a taxa de fotossíntese, sendo ela diretamente proporcional ao aumento da luminosidade, embora se torne gradativamente menos eficiente, até que, acima de 10.000 lux, o acréscimo da intensidade luminosa não corresponda a nenhum efeito na taxa fotossintética. Segundo GEORGE & SHERINGTON (1984), embora os efeitos da luz na fotossíntese sejam importantes na cultura de tecidos, a luz comum pode ser usada desde que sejam feitas combinações complementares adequadas com outros comprimentos de ondas. Segundo estes autores, o crescimento de tecidos vegetais organizados "in vitro", não é inibido pela intensidade luminosa geralmente requerida para atingir os melhores resultados fotossintéticos, embora, as divisões celulares iniciais dos explantes, e o crescimento dos tecidos de calo são algumas vezes impedidos por esta intensidade de luz. Existem diferenças marcantes relativas a estes aspectos no processo de cultura de tecido das diferentes espécies vegetais. Os mesmos autores acrescentam ainda,

que as intensidades luminosas variam normalmente de 5 a 25 W/m² (1000-5000 lux) aconselhando-se ao incremento dessa intensidade na fase III da cultura, para o início do processo de rustificação.

GEORGE & SHERRINGTON (1984), revelam que a qualidade da luz é dado pelo comprimento luminoso azul e ultravioleta próximo. Quanto ao crescimento do calo e morfogênese, pelo uso de fonte que emite luz de pequeno comprimento de onda, tem-se verificado que o ultravioleta próximo e a luz azul podem exercer certa influência na taxa de crescimento. Citam ainda que estudos têm demonstrado a importância da combinação comprimento de luz e intensidade luminosa nos efeitos morfogênicos. Em calos de tabaco, embora houvesse o crescimento no escuro, a luz ultravioleta próxima (371 nm) estimulou o crescimento do tecido caloso e formação de broto, em baixa irradiância, 24 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (= 90 lux), embora ocorresse a inibição, quando o fluxo incidente apresentou-se superior a 150 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (= 540 lux). E foi observado que, a luz azul de 420 ou 467 nm de comprimento de onda causou estímulos máximos a 300 e 600 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ($\approx$ 1080 e 2160 lux), respectivamente.

Literaturas anteriores relataram resultados conflitantes, onde Bergmann & Balz¹⁵, citados por GEORGE & SHERRINGTON (1984), observaram estímulo de crescimento em ca-

¹⁵ BERGMANN, L. & BALZ, A. Planta, 70: 285-303, 1966.

lo de tabaco sob luz azul (435 nm), a uma irradiância de 240 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ou 860 lux, embora posteriormente, também citados pelos mesmos autores, Weis & Jaffe¹⁶ tenham observado que a luz de composição espectral mista (1550 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ou 5600 lux) ou luz branca foi suficiente para o desenvolvimento de gema em calo de tabaco. Quanto aos comprimentos de luz verde e vermelho, não produziram efeitos.

Kadkade & Jopson¹⁷, citados por GEORGE & SHERRINGTON (1984), investigaram o efeito da luz na formação de brotos, em calos de embrião de *Pseudotsuga menziesii*. Notaram que a formação do calo foi estimulada pela luz de comprimento de onda entre 550 e 660 nm. Formou-se uma quantidade de gemas cinco vezes maior, em culturas expostas a 660 nm de luz (0,42 nW/cm^2) do que naquelas mantidas no escuro. Estes mesmos autores acreditavam ainda, que a luz estimulou a iniciação do broto, mas não o alongamento.

GEORGE & SHERRINGTON (1984), observaram que quanto à fotomorfogênese a luz induziu o desenvolvimento de estruturas ou formas, que necessariamente não envolviam a absorção de grande quantidade de energia luminosa, existindo entre tanto, certos sistemas morfogênicos que, para sua ocorrência exigiam exposição prolongada à luz. As respostas morfogênicas que se manifestam somente sob prolongada exposição a alta

¹⁶ WEIS, J.S. & JAFFE, M.J. Physiolog. Plant., 22:171-6, 1969.

¹⁷ KADKADE, P.G. & JOPSON, H.A. Plant Physiol., 59(6 suppl.), 62 (Abst. 343), 1977.

intensidade luminosa, envolve parcialmente o sistema fitocromo. As possíveis causas da inibição do crescimento, induzida pelo alto nível de luz azul e ultravioleta próximo são: aumento na produção de compostos fenólicos, que interferem na atividade dos reguladores de crescimento; destruição do citocromo oxidase, que é envolvido no processo respiratório e aumento da biossíntese de giberelina. Células e tecidos destas plantas, em testes de cultura "in vitro", tiveram crescimento inibidos quando adicionou-se ao meio 0,1 mg/l de ácido giberélico, embora em cultura de calos, tenha estimulado o crescimento de algumas outras plantas.

Segundo estes mesmos autores, a inibição do crescimento pela alta densidade de luz ultravioleta e azul, também poderia ser explicada pelo metabolismo acelerado e do AIA podendo ocorrer sua fotodegradação com presença da luz que sensibiliza a riboflavina ou algum outro tipo de flavonóide. Flavoproteínas inibidoras podem impedir o crescimento de calos expostos à luz. A luz pode acelerar a oxidação do AIA pela enzima peroxidase, através da regulação de co-fatores e inibidores de enzimas. Na maioria das culturas as células são estimuladas a se dividirem sob luz pela aplicação exógena do hormônio. Marcotrigiano & Stimari¹⁸, citados por GEORGE & SHERRINGTON (1984), notaram que em presença de luz, os hipocótilos de *Paulownia* sp. necessitaram de uma aplicação exógena

¹⁸ MARCOTRIGIANO, M. & STIMART, D.P. Hort. Science, 16: 405 (Abst. 048), 1981.

de 3 mg/l de AIA no meio para a produção de brotos em taxa máxima, enquanto que, no escuro, apenas 1 mg/l de AIA foi necessária. Para ambos os regimes a mesma concentração de citocinina foi necessário.

Nesta mesma época Behrouz & Lineberger (a,b)¹⁹, citados por eles, investigaram a interação entre a luz branca, azul, vermelha e verde (15 μ F m/seg) e os reguladores de crescimento ANA (0,1 mg/l) e BAP (2,5 mg/l) para a proliferação de brotos apicais de amoreiras.

O maior número de brotos foram obtidos pelo uso da luz azul ou branca junto com os hormônios auxina e citocinina e ainda constataram que, a luz ultravioleta podia induzir a atividade de enzimas específicas.

Para GEORGE & SHERRINTON (1984), o fotoperíodo, como qualquer outra resposta vegetal que é estimulada pela luz, pode ser substituída pela adição exógena dos fitoreguladores específicos ao meio de cultura. Algumas vezes, entretanto, o fotoperíodo adequado é indispensável, como na indução da formação de flores, em cultura de ápices de broto ou de explantes caulinares e, neste caso, o mesmo fotoperíodo que

¹⁹ BEHROUZ, M. & LINEBERGER, R.D. Hort. Science, 16: 406, (Abs. 52), 1981a.

BEHROUZ, M. & LINEBERGER, R.D. Hort. Science, 16: 453, (Abs. 398), 1981b.

causaria o florescimento, pode ser uma necessidade na planta inteira. Geralmente, nas câmaras de crescimento, a iluminação incidente é de 08/16 horas/dia.

b) A temperatura

As temperaturas necessárias para cultura "in vitro" são em média, ligeiramente superiores àsquelas exigidas pela mesma planta "in vivo". A temperatura é de aproximadamente 25°C (variando de um mínimo de 17° a um máximo de 32°C). Segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984), BONGA (1982), HALL & RAO (1978), a temperatura pode variar no mesmo local, em função dos efeitos da luz e da taxa de crescimento na cultura. Embora existam relatos de bons resultados morfogênicos, para algumas espécies, sob temperatura variáveis, (SOMMER & BROWN, 1979), ao observarem que a redução da temperatura na cultura "in vitro" favorecia ao enraizamento de "plântulas", grande parte dos resultados todavia, mostraram haver a existência de uma temperatura ótima. Evidencia desta forma, a necessidade de maiores informações sobre a influência da temperatura nos processos morfogênicos da cultura "in vitro".

c) A umidade

Este fator, não freqüentemente discutido em trabalhos de cultura de tecido é importante para evitar a perda de água do sistema "in vitro" para o ambiente circundante.

A umidade relativa no interior da câmara de diferenciação é normalmente ao redor de 70%, embora no interior dos tubos a mesma deva ser superior. Lane²⁰, citado por GEORGE & SHERRINGTON (1984), noticiou o crescimento de 3 ou 4 pares de brotos/tubo, e que a alta umidade foi necessária para a prevenção da necrose destes brotos. Observou ainda a ocorrência de injúrias quando a umidade no interior dos tubos ficaram abaixo de 95%, resultando em brotos com menos formação de raízes, enquanto que nos experimentos de Ziv et alii²¹, citados pelos mesmos autores, a umidade de 98% no interior dos recipientes favoreceu o aparecimento de brotos menores e vitricentes.

2.2.2.3. O explante

O desenvolvimento dos tecidos nas árvores es-

²⁰ LANE, W.D. In: TAMES, et alii (eds.), 1982. p.163-86.

²¹ ZIV, M.; MEIR, G.; HALEVY, A.H. Plant cell tissues. Organ Cult., 2: 55-65, 1983.

tão sob a influência de grande variação anual, mesmo quando os explantes são obtidos da mesma árvore, local e estação do ano. Esta variação é parcialmente causada pelo ciclo climático e oscilação dos outros fatores ambientais. Estes ciclos nas condições fisiológicas do crescimento arbóreo podem influenciar as respostas na cultura "in vitro".

Na cultura de tecidos de coníferas, a taxa de indução de gemas adventícias em explantes cotiledonares, está correlacionada com a taxa de crescimento da árvore matriz, com o tamanho das sementes e, ambos são influenciados pelos fatores ambientais, que merecem ser considerados no processo de escolha do explante (DAVID, 1982).

As exigências nutricionais e hormonais são diferentes para cada tipo de explante, devido aos diferentes teores endógenos destas substâncias. Desta forma, para estimar o balanço nutricional e hormonal mais adequado no meio de cultura, é importante conhecer o estado fisiológico do explante. Respostas morfogênicas não são sempre conseguidas mesmo com conhecimento do conteúdo endógeno dos hormônios, dos mecanismos de ação hormonal e das interações com o tecido, dos níveis molecular e celular, da variação na relação citocinina/auxina porque, segundo SHARP (1979) outros fatores químicos, têm função de controle na morfogênese.

Quando a fonte de explante é de origem jovem em se tratando de sementes, o tempo da embebição, o armazena

mento e estratificação, e as condições de germinação podem ser importantes, requerendo desta forma, maior atenção para o estado fisiológico e nutricional da planta matriz. SHARP (1979) chama a atenção para o fato de que existe uma grande variabilidade na resposta de explante para explante, de semente para semente (variações genéticas), aparecendo principalmente em espécies arbóreas, que apresentam alta heterogeneidade. Esta variabilidade pode ser reduzida, pelo manejo do meio de cultura e pela seleção dos explantes (pré-condicionamento, posição no ortete, tamanho, estado fisiológico, orientação do explante no meio de cultura, conhecimento dos padrões de crescimento, densidade de inoculação, polaridade de regeneração, etc.).

Considerando a possibilidade dos explantes terem as informações do local de onde provieram, tem-se trabalhado com material adulto de características juvenis ou jovens (BONGA, 1982).

Na cultura de tecidos de coníferas, tem-se trabalhado, preferencialmente, com material juvenil, originário de sementes ou de plântulas, do que com o material adulto, visto que são menores as dificuldades, no controle da morfogênese e obtenção de cultura em condições assépticas (MOTT et alii, 1977; AITKEN et alii, 1981; DAVID, 1982; THORPE & BIONDI, 1984; AMERSON et alii, 1985; FRANCO & SCHWARZ, 1985; PENCHEL & KIRBY, 1986, THORPE & PATEL, 1986; SMITH, 1986; FRAMPTON JR. & ISIKI, 1987; BOULAY, 1987).

DURZAN (1984), quando fala dos explantes juvenis em relação ao adulto, considera como fatores de seleção a juvenilidade e ciclo de determinação (tempo de duração da fase juvenil, detecção da fase juvenil ou adulta, detecção do valor genético envolvido, a posição da matriz em que é retirado, idade do explante e fatores micro ambientais). No processo seletivo, refere-se ainda ser necessário considerar explantes com células que eventualmente entrem em meiose, porque estas podem ser as únicas células no corpo vegetal cujo núcleo não amadureceu, e onde a reprodução do núcleo para a embriogênese tem-se tornado impossível. Observou-se que a estabilidade genética e juvenilidade são provavelmente melhores retidas em linhagens de células que são separadas do embrião com baixo número de mitoses, sendo importante que os explantes sejam portadores de tais linhagens de células relativamente inativas para serem cultivadas. É também aconselhável, limitar o número de divisões celulares entre a excisão do tecido e a indução da morfogênese, ou seja, o intervalo do estádio de calo deve ser encurtado e, ainda, aconselha-se que os tecidos selecionados para a cultura tenham recentemente experimentado a redução no número ou complexidade das organelas citoplasmáticas.

Desta forma, BONGA (1982), considera as seguintes partes do vegetal, com exceção do embrião, serem as mais adequadas para excisão e cultura "in vitro": a) **parte das flores** - tecido somático de flores de muitas plantas tem

uma alta capacidade para reprodução vegetativa, possivelmente devido a sua proximidade às células sexuais rejuvenescentes. Em essências arbóreas, a morfogênese tem sido obtida em cultura de tecido somático de gemas floríferas de várias espécies, e a desdiferenciação celular ocorre justamente antes ou pouco depois da indução floral, justificando assim, a colheita prematura dos explantes; **b) gemas vegetativas** - gemas ou parte delas, freqüentemente têm sido usadas como explantes em experimentos destinados a obter propagação vegetativa de árvores. O ápice do meristema apical caulinar apresenta suas células com baixa taxa de divisão mitótica e baixo número de ribossomos ambos, podem ser significativos para a capacidade morfogênica do tecido. Na cultura de gemas de *Pinus*, retiradas de árvores adultas, pequenas estruturas como gemas foram obtidas, concentrando-se na base das acículas jovens; **c) raízes** - o ápice da raiz possui capacidade de dar origem a gemas, em sistemas de cultura "in vitro". **d) colo** - acredita-se que esta região possa conter brotações jovens, dormentes, que poderiam se desenvolver em rebrotos, se a árvore fosse abatida ou severamente podada. Estas brotações têm sido empregadas em clonagem de sequóia. BONGA (1982), enfatiza ainda, o fato de que muitos tecidos adequados para a micropropagação "in vitro", são compostos de células com baixo número de organelas ou de organelas estruturalmente simples.

De maneira geral, quanto mais jovem for o explante, melhor é sua resposta ao processo de diferenciação

na cultura "in vitro". AITKEN et alii (1981) notaram a importância da seleção do explante na formação de brotos adventícios em cultura de *Pinus radiata*, usando cotilédones excisados de embriões. Observaram que, pelo uso de cotilédones excisados de sementes recém-germinadas, a capacidade de formar brotos acelerou-se de 12 vezes ou mais em relação ao uso dos cotilédones dos embriões. Este estudo, mostrou também que, mesmo a diferença de poucos dias, afeta muito a capacidade morfogênica dos cotilédones, confirmando a existência de razões obscuras, para a dupla faixa de variação nas respostas morfogênicas da cultura de coníferas.

Em Pinaceae, os embriões excisados e partes de plântulas jovens (cotilédones, hipocótilo e nódulo cotiledonar) têm sido usados como fonte de explante para iniciação da cultura de gemas adventícias (MEHAPALTA et alii, 1978; BROWN & SOMMER, 1979; MOTT & AMERSON, 1981; AITKEN & THORPE, 1981; BONGA & DURZAN, 1982; AITKEN et alii, 1984; THORPE & PATEL, 1986). THORPE & BIONDI (1984) dizem que, independentes do tipo de explante estas gemas podem se formar diretamente nos explantes sem qualquer formação de calo.

As sementes podem se constituírem em material conveniente para o trabalho de cultura de tecido. Após lavagem e esterilização de sua superfície, elas podem se desenvolver em meio nutritivo e dar origem diretamente à cultura de calo, ou germinarem em um meio simples, sem regulador

de crescimento, produzindo plântulas livres de contaminantes, que poderão então serem seccionadas sob condições assépticas e usadas como explantes. Tecidos vegetais internos, especialmente aqueles de órgãos grandes, tais como tubérculos ou raízes de reserva são boas fontes de células na cultura de calo, por serem naturalmente livres de contaminação (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

A esterilização, segundo estes mesmos autores, (limpeza da parte externa da planta de onde o explante será removido) reduz a contaminação e a mesma pode ser realizada com lavagem em água corrente, água com sabão, ou com qualquer outro detergente, que possa facilitar a ação do agente descontaminante sobre a superfície do explante. Vários produtos podem ser usados nesta operação, dentre eles o hipoclorito de sódio (0,5 - 2% w/v) e o hipoclorito de cálcio, numa solução filtrada (5 - 10% w/v) são os mais comumente empregados. Embora o hipoclorito de cálcio seja menos convenientemente manejável e nem sempre efetivo na remoção dos contaminantes, pode ser o menos tóxico ao vegetal. A água sanitária doméstica é fonte de NaOCl e por isto, usada por muitos laboratórios em 10 - 20% da concentração original, neste processo de descontaminação.

Alguns autores afirmam que 10 minutos de imersão em bactericida foi mais efetivo do que NaOCl, para esterilização de sementes ou cultura de embrião, e que a penetração do agente esterilizante foi consideravelmente aumentada

pela rápida imersão em etanol 70% GL (30"-1' para material tenro e 1'a 2' para sementes).

GEORGE & SHERRINGTON (1984), dizem ser importante considerar o período de exposição ao agente desinfetante, visto que períodos longos poderão danificar o tecido e muito curto, não destruirá os microorganismos. Dados experimentais revelaram que 5 minutos de exposição em NaOCl a 1% foi mais efetivo para o processo de descontaminação em estacas de caule do que 5 - 10 minutos em 0,1%. O tempo de exposição, depende do material que está sendo desinfestado, pois explantes de diferentes partes da planta, variam em sensibilidade à solução esterilizante. A correta escolha do explante inicial da cultura, permite reduzir a superfície de contaminação.

Para algumas espécies de plantas vegetais, principalmente as espécies tropicais, que possuem alta concentração de substâncias fenólicas e que se oxidam quando as células estão feridas ou senescentes, provocam o escurecimento do explante e a interrupção do crescimento. Geralmente, a estes meios de cultura são adicionados anti-oxidantes como medida preventiva.

Para GEORGE & SHERRINGTON (1984), as células vegetais normalmente não crescem em populações de baixa densidade, porque elas perdem por difusão, certas substâncias essenciais, e conseqüentemente, tanto a concentração do meio

de cultivo, como o interior celular tornam-se inadequados. Isto significa a necessidade de um tamanho mínimo de explantes com certa quantidade de células separadas por unidade de volume da cultura, para instalação da mesma com sucesso. A densidade de inoculação também afeta a taxa inicial de crescimento "in vitro". Explantes maiores, geralmente sobrevivem e crescem mais rapidamente no início do que pequenos pedaços. Para início de culturas em suspensão, a densidade mínima de inoculação é comumente cerca de $1 - 1,5 \times 10^4$ células/ml. O fenômeno da densidade mínima é algumas vezes chamado de "efeito feeder", pois as deficiências da célula podem frequentemente ser resultantes da presença de outras células crescendo na vizinhança.

Segundo estes mesmos autores, as deficiências podem ser superadas pelo "condicionamento" em meio fresco preparado. As seguintes substâncias podem ser liberadas no meio pelas culturas: alcalóides, aminoácidos, enzimas, substâncias de crescimento e vitaminas. Poucos são os casos em que a adição exógena de substâncias definidas têm sido eficazes em superar as deficiências celulares, embora alguns pesquisadores mostraram que células e protoplastos de algumas culturas, poderiam se desenvolver em meio mesmo à baixa densidade, quando o meio era suplementado com as substâncias necessárias.

O padrão de crescimento e diferenciação no de

envolvimento de um calo vegetal típico e não organizado pode começar com um novo explante ou com um pedaço de uma cultura previamente estabelecida e possuem 3 estádios de desenvolvimento: **a)** a indução da divisão celular; **b)** período de efetiva divisão celular durante o qual células desdiferenciadas ou não diferenciadas se dividem e redividem; **c)** período quando a divisão celular diminui ou cessa e dentro dos calos há o aumento da diferenciação celular.

Segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984), estas fases são similarmente reproduzidas por cultura em suspensão e permitem que diferentes parâmetros possam ser usados para medir o crescimento, como número de células, peso seco celular, conteúdo total de DNA ou através de uma curva de crescimento. Este gráfico se caracteriza por uma fase atrasada, que é seguida por um período de crescimento exponencial ou então linear, e finalmente, uma fase estacionária, quando o crescimento declina e paralisa. Alguma diferenciação pode ocorrer exatamente na fase estacionária, mas é menos acentuada, e menos completa do que aquela que ocorre em cultura de calo. As culturas não podem ser mantidas em fase estacionária por longos períodos, pois as células começam a morrer e seu conteúdo se espalha no meio de crescimento acelerando a morte da cultura inteira.

Em culturas de estruturas organizadas ocorrem um padrão de crescimento semelhante. O crescimento cessa quando os componentes do meio ficam exauridos. Relatos

similares sobre o padrão de crescimento e avaliação por peso fresco e seco, são também apresentados por YOGOMAN (1973).

Segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984), a cultura de tecido necessita de subcultivo, tornando-se imperativa para mantê-la viva e aumentar o seu volume. A duração de uma subcultura é algumas vezes chamada de passagem. O crescimento de calos em frascos fechados, conduz eventualmente a um acúmulo de metabólitos tóxicos e a exaustão ou secagem do meio. As subculturas devem ser feitas para meio fresco a intervalos que dependem da taxa de crescimento do calo. Nos estádios iniciais de crescimento do calo, pode ser conveniente transferir o pedaço inteiro do tecido para meio fresco, mas em fases mais avançadas, necessitaria ser dividida em pequenas porções e usadas como inóculo. O recrescimento depende da transferência e da saúde do tecido. Culturas em suspensão apresentam necessidades similares e precisam ser subcultivadas antes ou na fase estacionária. As células, na fase estacionária tendem a agregarem-se, e daí as subculturas serem geralmente feitas no máximo até quando for alcançada a máxima densidade celular. Taxa rápida de propagação, depende também da habilidade para subcultura de brotos oriundos de culturas de brotos proliferantes, de culturas dando regeneração direta de brotos, ou cultura de calos capazes de segurar regeneração em brotos ou embriões.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Local do experimento

Os experimentos foram conduzidos nos Laborat^orios de Fisiologia das Árvores e de Sementes Florestais do Departamento de Ciências Florestais, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, em Piracicaba-SP, no período de 09 de junho a 30 de setembro de 1988.

3.1.2. Escolha da espécie em estudo

A escolha recaiu sobre o *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. et Golf., devido sua importância para os programas de melhoramento, conservação genética e da necessidade de informações sobre a clonagem através das técnicas da cultura "in vitro".

3.1.3. Origem das sementes e explantes

Sementes de *P. caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. et Golf., oriundas de polinização livre, foram coletadas de 5 árvores matrizes, tomadas aleatoriamente dentro de uma população de árvores selecionadas em uma Área de Produção de Sementes, com cerca de 30 anos de idade, localizada na Fazenda Monte Alegre, município de Agudos-SP, pertencente à Freudenberg Agro Florestal.

Dez gramas de sementes de cada árvores matriz foram utilizadas para: composição dos testes de germinação, determinação dos parâmetros iniciais das plântulas e dos explantes e, das fontes de explantes para o estabelecimento da cultura "in vitro".

3.1.4. Meio de cultura

A composição química dos meios de cultura utilizada como base para, o estabelecimento e manutenção da cultura de *Pinus* "in vitro", se encontra na **Tabela 1**. Essas composições químicas dos meios de cultura foram empregados de acordo com FRANCO & SCHWARZ (1985), O MSM - sais de MURASHIGE & SKOOG (1962) modificado, e de sua variação para *Cupressus*, acrescido dos sais de Lind & Staba, compostos orgânicos de Nitsch & Nitsch e da solução de ferro de MURASHIGE & SKOOG (1962). Estes meios de cultura foram suplantados, ainda com sacarose, ágar difco e com os reguladores de crescimento.

Tabela 1. Composição química do meio de cultura utilizada como base para o estabelecimento e manutenção da cultura de *Pinus* "in vitro".

Compostos	Concentração (mg/l)			
	MSM		CBM	
	F-2.0	F-3.0	F-2.1	F-3.1
Macronutrientes				
NH ₄ NO ₃	825	825	720	720
KNO ₃	950	950	950	950
CaCl ₂ .2H ₂ O	220	220	220	220
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	185	185	185
KH ₂ PO ₄	85	85	68	68
Micronutrientes				
FeSO ₄ .7H ₂ O	6,0	6,0	27,8	27,8
Na ₂ EDTA	7,2	7,2	37,3	37,3
H ₃ BO ₃	3,1	3,1	2,4	2,4
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,25	5,25	4,5	4,5
KI	0,40	0,40	0,375	0,375
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,15	0,15	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,013	0,013	0,01	0,01
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,013	0,013	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	8,45	8,45	7,0	7,0
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	-	-	0,093	0,093
Vitaminas e outros compostos orgânicos				
Meso Inositol	250,0	250,0	100,0	100,0
Tiamina HCl	2,5	2,5	0,5	0,5
Ácido nicotínico	-	-	5,0	5,0
Piridoxina HCl	-	-	0,5	0,5
Ácido fólico	-	-	0,5	0,5
Biotina	-	-	0,05	0,05
Sacarose (%)	3	2	3	2
Ágar difco (%)	1	1	0,7	0,7
ANA (nM)	25	-	-	-
BAP (µm)	25	-	5	-
IBA (nM)	-	-	5	-

Onde: MSM e CBM - são variações da composição dos sais de MU RASHIGE & SKOOG (1962).

F = 2,0; 3,0; 2,1 e 3,1 - são as diferentes fases da cultura. Com 25 dias (F=2,0 e 2,1) com fito-hormônios e com 75 dias (F=3,0 e 3,1) sem fito-hormônios.

Fonte: FRANCO & SCHWARZ (1985).

3.1.5. Recipientes utilizados para a cultura

Foram utilizados tubos de ensaio de 18x150mm, como recipiente contendo 10 ml do meio de cultura específico, tampados com algodão hidrófilo envolto em gaze, acondicionados em raques.

3.1.6. Condições ambientais de cultura

Os testes realizados sob fotoperíodo de 16 - 8 horas e intensidade luminosa de 900 lux (50% lâmpadas fluorescentes Philips "luz do dia" TL 20 W/54 RS e 50% lâmpadas Sylvania GRO-LUX F20/GRO/U). Os dados de temperatura no interior da câmara de diferenciação, durante a fase experimental, se encontram na **Tabela 2**.

3.1.7. Outros materiais utilizados

Para as atividades de inoculação e transferência, foram utilizadas placas de Petri, Erlenmeyers, bastonetes de vidro, beackers, complementando a parte das vidrarias úteis ao experimento. Nas lavagens e preparo dos meios de cultura, empregou-se água deionizada. A operação de esterilização foi realizada por autoclavagem, à temperatura de 120°C, uma atmosfera de pressão (1 atm), durante 20 minutos.

Tabela 2. Média das temperaturas semanais, noturnas e diurnas ($^{\circ}\text{C}$) com as respectivas amplitudes de variação, ocorridas no interior da câmara de diferenciação, durante a fase experimental.

Mês	Semanas	Temperatura média noturna (°C)	Amplit. de variação semanal noturna (°C)					Temperatura média diurna (°C)	Amplit. de variação semanal diurna (°C)					Amplit. de variação da semana (°C)
			1.ª 2.ª 3.ª 4.ª 5.ª						1.ª 2.ª 3.ª 4.ª 5.ª					
			1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª		1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	
Junho	1.ª	20,4	-	-	-	-	-	22,3	-	5,9	3,0	6,6	-	1,9
	2.ª	25,3	4,9	-	-	-	-	28,2	-	-	2,9	0,7	-	2,9
	3.ª	22,6	2,2	2,7	-	-	-	25,3	-	-	-	3,6	-	2,7
	4.ª	26,4	6,0	1,1	3,8	-	-	28,9	-	-	-	-	-	2,5
Julho	1.ª	26,6	-	-	-	-	-	28,9	-	0,2	3,8	3,8	-	2,3
	2.ª	26,1	0,5	-	-	-	-	28,7	-	-	3,6	3,6	-	2,6
	3.ª	22,5	4,1	3,6	-	-	-	25,1	-	-	-	-	-	2,6
	4.ª	23,1	3,5	3,0	0,6	-	-	25,1	-	-	-	-	-	2,0
Agosto	1.ª	23,5	-	-	-	-	-	25,9	-	3,8	3,1	5,8	6,7	2,4
	2.ª	25,1	1,6	-	-	-	-	28,1	-	-	0,9	3,6	4,5	3,0
	3.ª	26,4	2,9	1,3	-	-	-	29,0	-	-	-	2,7	3,6	2,6
	4.ª	28,9	5,4	3,8	2,5	-	-	31,7	-	-	-	-	0,9	2,8
	5.ª	30,1	6,6	5,0	3,7	1,2	-	32,6	-	-	-	-	-	2,5
Setembro	1.ª	29,2	-	-	-	-	-	32,1	-	3,6	2,0	2,0	-	2,9
	2.ª	25,7	3,5	-	-	-	-	28,5	-	-	1,6	1,6	-	2,8
	3.ª	29,8	0,6	4,1	-	-	-	30,1	-	-	-	-	-	0,3
	4.ª	29,3	0,1	3,6	0,5	-	-	30,1	-	-	-	-	-	0,8

onde: para a temperatura média semanal, foi considerada a média dos dados de temperaturas diárias obtidas por leituras diretas em termômetro de coluna de mercúrio, no período diurno (07:00 as 17:00 horas) e noturno (18:00 as 06:00 horas). Para as amplitudes foram consideradas as diferenças entre as correspondentes médias semanais noturnas e diurnas, dentro e entre semanas.

3.2. MÉTODO

3.2.1. Germinação das sementes

Dez sementes foram aleatoriamente escolhidas do lote de sementes de cada árvore matriz, e devidamente identificadas, foram colocadas em gerboxes (caixas plásticas) previamente desinfectados com etanol 90%, alojadas sobre 5 folhas de papel de filtro previamente umedecidos com água destilada. Cada conjunto recebeu a identificação e foi colocado em germinador FANEM 348, sob luz fluorescente de 400 lux "luz do dia", com temperaturas alternadas de 30°C e 20°C, sob fotoperíodo de 16 - 08 horas, com 90% de umidade, por um período de 18 dias, e findo o qual, obtiveram-se as progênies para as fontes de explantes.

3.2.2. Implantação da cultura "in vitro"

a) Desinfestação das plântulas

Cada plântula foi colocada em erlenmeyer de 125 ml, onde recebeu o seguinte tratamento de desinfestação:

- 1) desinfestação por imersão, em solução aquosa de neantina (1,5% Hg em forma de acetato mercuri-fluídico) a 100 mg/l e benlate (metil-1-(butilcarbamoil)-2-D-benzimidazol carbamato benomil) à concentração de 300 mg/l, com agitação constante, por um período de 20 minutos;
- 2) desinfestação por imersão,

em solução aquosa de hipoclorito de sódio, a uma concentração de 30%, com agitação constante, por um período de 15 minutos; 3) desinfestação por imersão em solução aquosa de kasumin, a uma concentração de 2 ml/l, com agitação constante, por um período de 5 minutos.

Completado o período de desinfestação (40 minutos) as plântulas foram manipuladas nas atividades seqüenciais, no interior da câmara de fluxo laminar, de acordo com WITHERS (1985), sob condições assépticas.

b) Caracterização dos explantes

Após o tratamento de desinfestação, 10 plântulas (progênies) de cada árvores matriz foram seccionadas em segmentos com comprimentos variando entre 1,0 e 1,5 cm, para configuração dos explantes. Utilizou-se em cada plântula de progênie todos os segmentos cotiledonares (a0 e a1), o nó cotiledonar (b0) e os 3 segmentos hipocotilares (c0, c1 e c2). A **Figura 3** apresenta esquematicamente o estágio de desenvolvimento da plântula após os 18 dias do início da germinação, assim como sua subdivisão e configuração dos explantes. A **Tabela 4**, apresenta os dados de médias dos pesos (g) de matéria fresca e seca, e das porcentagens médias de umidade e de matéria seca, da muda inteira e por explante, no estágio inicial da cultura (estádio evolutivo 0), das diferentes matrizes.

Figura 3. Apresentação esquemática da plântula de *P. caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. et Golf., com 18 dias do início da germinação e sua respectiva divisão indicando os diferentes tipos de explantes. Onde a $\emptyset$ e a 1 são explantes do cotilédone; b $\emptyset$ é explante do nó cotiledonar e c $\emptyset$, c 1 e c 2 são explantes do hipocótilo.

c) Inoculação dos explantes

As plântulas foram transferidas individualmente para placas de Petri, logo após lavagem em 3 baterias de água. O manuseio das mesmas ocorreu com auxílio de pinças e de bisturis, previamente imersos em etanol 90% e flambados em bico de Bunsen, no interior da câmara de fluxo laminar.

As mesmas foram seccionadas em segmentos únicos, passando a configurar nos explantes para o início e estabelecimento da cultura "in vitro", recebendo identificação externa nos tubos de ensaio. Para o início e estabelecimento da cultura, foram utilizados a composição dos meios apresentados na Tabela 1, com pH ajustado para 5,5 com solução de KOH 1N antes da autoclavagem.

Os explantes cotiledonares foram transferidos para os tubos de ensaio contendo o meio (MS) da fase 2 (com regulador de crescimento 25 nM ANA e 25 μ M BAP), em uma primeira etapa, e fase 3 (sem os reguladores de crescimento) em etapa posterior. Os explantes do nó cotiledonar (b 0) e do hipocótilo (c 0, c 1 e c 2) foram transferidos para os tubos de ensaio contendo o meio (CB) da fase 2,1 (com regulador de crescimento 5nM IBA e 5 μ M BAP) em uma primeira etapa, e fase 3,1 (sem o regulador de crescimento) em uma etapa posterior.

Os explantes cotiledonares e hipocotilares foram horizontalmente colocados e levementes pressionados sobre

os respectivos meios de cultura, enquanto que os explantes do no cotiledonar eram inseridos verticalmente no meio de cultura, a uma profundidade aproximada de 3 mm. Ap^os a inocula^o dos explantes nos meios de cultura das fases 2,0 e 2,1 os mesmos foram mantidos em c^amara de crescimento por 25 dias. Transcorrido esse perⁱodo da cultura, os explantes foram transferidos para os meios de cultura das fases 3,0 e 3,1 com procedimento de inocula^o semelhante ao das fases anteriores em bora permanecessem, em cultura por mais um perⁱodo de 75 dias, findo o qual, foram feitas as avalia^oes finais.

3.2.3. Avalia^o

a) N^umero de avalia^oes e épocas

Foram efetuadas 3 avalia^oes no decorrer da fase experimental. As mesmas foram realizadas aos 7, 25 e 100 dias de cultivo e, em todos os levantamentos, foram observadas a ocorr^ência ou n^o da morfog^ênese, seu padr^o de manifesta^o nos crit^érios adotados, al^ém dos dados de sobreviv^ência para os diferentes explantes considerados.

b) Par^âmetros quantitativos

Quanto às avalia^oes, foram mensuradas por amos tragem dos explantes em desenvolvimento os seguintes par^âme-

tros: peso úmido do material fresco (PF), peso do material seco (PS), através dos quais calculou-se a percentagem de umidade (U %), e a percentagem de matéria seca (MS%), com base no peso úmido do material fresco. Os parâmetros indicativos da oxidação fenólica também foram observados.

Os dados do comprimento dos explantes, comprimento total da plântula e número de cotilédones foram coletados por ocasião do preparo do material para inoculação, antes do estabelecimento da fase 2, e constam na Tabela 3. Os demais parâmetros foram coletados nas 3 avaliações efetuadas.

Os pesos de matéria fresca e de matéria seca foram obtidos por pesagens diretas dos materiais nas respectivas condições, em balança analítica Mettler com precisão de 0,0001 g. Antes da pesagem da matéria seca foi necessária a secagem dos materiais até peso constante, a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em estufa com circulação de ar forçada.

As percentagens de umidade (U%) e de matéria seca (MS%) foram calculadas com base em peso úmido do material fresco (PF), através das seguintes fórmulas:

$$U\% = \frac{PF - PS}{PF} \cdot 100$$

$$MS\% = \frac{PS}{PF} \cdot 100$$

Tabela 3. Comprimento médio (cm) dos diferentes explantes (E.0 para produção de calo e G 1 para produção de gemas) por matriz, obtidos de 10 plântulas de progênes e por tipo de explante, desvio padrão das médias, número de folhas cotiledonares de maior frequência, nas plântulas consideradas/matriz de *P. catibaea* var. *hondurensis*.

Segmentos	C O M P R I M E N T O (cm)												Comprimento médio do explante
	M 1		M 2		M 3		M 4		M 5		MT	ST	
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s			
a 0	1,6500	0,0583	1,6900	0,0544	1,8200	0,0500	1,5900	0,0244	1,6800	0,0700	1,6800	0,0514	
a 1	1,3100	0,0953	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3100	0,0953	
b 0	0,9700	0,1676	0,9100	0,2165	1,1100	0,1865	1,0000	0,1264	0,9100	0,1700	0,9800	0,1734	
c 0	0,9900	0,1044	0,9200	0,1248	0,9200	0,1777	0,8600	0,1562	0,9600	0,1000	0,9300	0,1326	
c 1	1,0200	0,1161	1,0600	0,0916	1,1500	0,1746	1,0400	0,1356	1,0300	0,0780	1,0600	0,1192	
c 2	1,1000	0,1000	0,9400	0,1180	-	-	-	-	0,9330	0,1690	0,9910	0,1290	
Comprimento total	5,2600	0,4980	7,4500	0,6500	5,1200	0,7222	4,7100	0,3832	4,7100	0,6310	5,4500	0,5769	
Número de cotilédones	6	-	8	-	7	-	6	-	7	-	7	-	

onde: a 0, a 1, b 0, c 0, c 1 e c 2 = se constituem dos diferentes segmentos das plântulas consideradas como explantes; m = média das medidas de comprimento (cm), dos segmentos considerados como explantes, nas diferentes progênes; s = desvio padrão das médias; M 1, M 2, M 3, M 4 e M 5 = se constituem das 5 diferentes progênes consideradas na experimentação; Número de cotilédones = número de folhas cotiledonares de maior frequência, nas 10 plântulas consideradas como fontes de explantes; em cada matriz do experimento.

Tabela 4. Quadro demonstrativo dos dados das médias dos pesos frescos e secos (g) e das porcentagens de unidade e de matéria seca, da muda inteira e por explante, no estágio inicial da cultura (E0 para produção de calo e G1 para produção de gema) das diferentes progênies.

MATRIZ E PA- RALETTROS.		M 1				M 2				M 3			
		PESO (g)		%		PESO (g)		%		PESO (g)		%	
		FRESCO	SECO	UNIDADE	MAT. SEC.	FRESCO	SECO	UNIDADE	MAT. SEC.	FRESCO	SECO	UNIDADE	MAT. SEC.
a 0	m	0,0216	0,0077	58,1524	41,8476	0,0290	0,0052	80,4673	19,5327	0,0241	0,0042	82,6810	17,3191
	s	0,0103	0,0039	15,9168	15,9168	0,0104	0,0024	7,7376	7,7376	0,0102	0,0020	4,4096	4,4096
a 1	m	0,0088	0,0027	64,4195	35,5804	0,0049	0,0003	93,1585	6,8415	0,0027	0,0006	78,5223	21,3676
	s	0,0024	0,0014	22,1908	22,1908	0,0011	0,0001	4,9833	4,9833	0,0003	0,0004	17,4347	17,4347
b 0	m	0,1168	0,0172	84,4476	15,5523	0,1473	0,0190	87,2877	12,7123	0,1286	0,0129	89,7605	10,2390
	s	0,0025	0,0006	5,5395	5,5395	0,0038	0,0010	4,4949	4,4949	0,0021	0,0004	3,1584	3,1584
c 0	m	0,0829	0,0122	84,2603	15,7393	0,1040	0,0103	89,3032	10,6967	0,0719	0,0074	89,4374	10,5626
	s	0,0019	0,0004	6,4051	6,4050	0,0017	0,0006	6,7272	6,7272	0,0016	0,0003	4,2429	4,2429
c 1	m	0,0585	0,0093	83,6580	16,3420	0,1130	0,0101	90,9820	9,0179	0,0826	0,0100	87,6526	12,3477
	s	0,0014	0,0006	7,2883	7,2883	0,0014	0,0002	1,8690	1,8690	0,0012	0,0004	4,6547	4,6547
c 2	m	0,0147	0,0025	83,0555	16,9444	0,0914	0,0101	88,5146	11,4854	0,0055	0,0011	80,0000	20,0000
	s	0,0001	0,0002	3,0556	3,0556	0,0022	0,0002	2,5226	2,5226	0	0	0	0
MUDAS INTEI.	m	0,3033	0,0516	76,3322	23,6677	0,4896	0,0550	88,3855	11,7144	0,3154	0,0362	84,6923	15,3060
	s	0,0186	0,0071	10,0660	10,0660	0,0206	0,0045	4,7224	4,7224	0,0154	0,0035	6,7801	6,7801

onde: a 0, a 1, b 0, c 0, c 1 e c 2 = se constituem nos diferentes segmentos das plântulas consideradas como explantes; m = médias dos pesos (g) de massa fresca e massa seca por explante; s = desvio padrão da média; M 1, M 2, M 3, M 4 e M 5 = se constituem das 5 diferentes progênies consideradas na experimentação.

M 4				M 5				MEDIDAS GERAIS DA ESPÉCIE			
PESO (g)		%		PESO (g)		%		PESO (g)		%	
FRESCO	SECO	UNIDADE	MAT. SEC	FRESCO	SECO	UNIDADE	MAT. SEC	FRESCO	SECO	UNIDADE	MAT. SEC
0,0282	0,0080	72,500	27,4989	0,0223	0,0080	62,4054	37,5945	0,0250	0,0060	71,2414	28,7586
0,0095	0,0029	7,5095	7,5095	0,0042	0,0009	5,2456	5,2456	0,0030	0,0016	9,6640	9,6640
///	///	///	///	///	///	///	///	0,0055	0,0012	78,7334	21,2632
///	///	///	///	///	///	///	///	0,0025	0,0011	11,7329	11,7328
0,1255	0,0022	81,972	18,0291	0,0969	0,0202	78,8817	21,1182	0,1230	0,0183	84,4701	15,5302
0,0019	0,0006	5,1008	5,1008	0,0035	0,0007	5,6329	5,6329	0,0164	0,0031	3,8312	3,8316
0,0820	0,0121	85,521	14,4789	0,0695	0,0100	85,8682	14,1318	0,0821	0,0104	86,8780	13,1220
0,0008	0,0005	4,9422	4,9422	0,0011	0,0004	5,5336	5,5336	0,0122	0,0017	2,1045	2,1046
0,0866	0,0166	80,491	19,5085	0,0688	0,0124	82,0692	17,9307	0,0819	0,0117	84,9706	15,0294
0,0013	0,0007	8,5418	8,5421	0,0010	0,0003	3,7695	3,7695	0,0185	0,0027	3,8349	3,8349
///	///	///	///	0,0191	0,0027	86,7801	13,2198	0,0327	0,0041	84,5875	15,4124
///	///	///	///	0,0017	0,0004	3,5294	3,5294	0,0343	0,0095	3,3023	3,3023
0,3223	0,0389	80,1213	19,8788	0,2766	0,0533	79,2001	20,7999	0,3414	0,0470	81,7263	18,2732
0,0135	0,0047	6,5236	6,5236	0,0115	0,0027	4,7422	4,7422	0,0159	0,0045	6,5670	32,8349

Quanto a produção de calos pelos explantes, o peso úmido de material fresco e o peso de matéria seca foram obtidos através de amostragem, considerando-se em média 10 representantes dentro de cada classe de nota dos estádios evolutivos considerados (Tabela 5). As percentagens de umidade e de matéria seca também foram determinadas.

Considerou-se os explantes em desenvolvimento aqueles que apresentavam modificações nas seguintes características: cor, estado fisiológico, turgidez e eventos morfogênicos. Na constatação da presença ou ausência destas características que evidenciavam suas atividades metabólicas, eles foram classificados de: **a)** em desenvolvimento e **b)** paralisado. A contagem do número de explantes que se apresentaram em desenvolvimento ou não foi realizada com o auxílio de lupa binocular (mod. 568-1.0 T.O./2,5 x), com aumento de 10 vezes.

A transformação dos dados em percentagem obedeceu a seguinte fórmula:

$$EDI_x(\%) = \frac{\text{nº de explantes (x) em desenvolvimento}}{\text{nº total de explantes do tecido x}} \cdot 100$$

onde:

EDI = percentagem de explantes em desenvolvimento

x = cotilédone, nó cotiledonar e hipocótilo

$$ED_{px}(\%) = \frac{\text{nº de explantes (x) com características não modificadas}}{\text{nº total de explantes do tecido x}} \cdot 100$$

onde:

ED_{px} = percentagem de explantes de desenvolvimento paralisado

x = cotilédone, não cotiledonar e hipocótilo

Com auxílio da lupa avaliou-se também, a oxidação fenólica, através da contagem numérica dos explantes que apresentaram modificações da cor verde para o marrom no decorrer das avaliações. A transformação dos dados em percentagem obedeceu a seguinte fórmula:

$$O F_x(\%) = \frac{\text{nº de explantes (x) oxidados}}{\text{nº total de explantes do tecido x}} \cdot 100$$

onde:

O F = percentagem de explantes oxidados

x = cotilédone, não cotiledonar e hipocótilo

No processo de avaliação, ao se constatar a presença de explantes contaminados por fungo e/ou bactéria, estes eram a partir de então eliminados e desconsiderados para as futuras observações, provocando heterogeneidade no número de explantes avaliados entre os diferentes tipos e épocas.

c) Parâmetros qualitativos

Como parâmetro qualitativo, considerou-se evolução morfogênica da formação dos calos e das gemas apresentada pelos diferentes explantes ao longo do período da fase experimental. A evolução foi estabelecida através de notas relativas atribuídas pela alteração do volume dos explantes, modificação da epiderme e de sua respectiva textura em relação ao estágio inicial (E 0 e G 1). As notas qualitativas atribuídas para a produção de calos e de gemas constam nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Juntamente com as notas comparativas de calo, foram acrescentadas informações quanto a sua cor, friabilidade e possível origem.

Em termos de cor, considerou-se os seguintes padrões:

- verde: explantes verdes e explantes com tendência a essa cor;
- marrom: explantes com início de oxidação e oxidados;
- amarelo: explantes de cor clara e tendência não definida.

Tabela 5. Notas evolutivas atribuídas comparativamente aos estádios evolutivos dos explantes para produção de calo, no decorrer da fase experimental.

Notas evolutivas	Descrição do estágio evolutivo Eventos considerados
E 0	Segmento com características semelhantes ao estágio inicial de cultura, sem entumescimento, rachaduras ou qualquer outro fenômeno de fácil observação.
E 1	Segmento entumescido com visível alteração de seu volume, superfície sem rachaduras e sem vestígios de massas de calos.
E 2	Segmento entumescido, com visível alteração de seu volume, sem rachaduras, pouco aparecimento de calo na extremidade do corte.
E 3	Segmento entumescido não rachado, com massa de calos nas extremidades do segmento próximo a 50% do comprimento do explante que lhe deu origem.
E 4	Explante original visivelmente entumescido e rachado, sem massa calosa, visível na região cambial do explante na extremidade do corte.
E 5	Explante original entumescido, rachado, com aparecimento de calo na região cambial da extremidade de corte.
E 6	Explante original entumescido, rachado, com massa calosa na extremidade do segmento próximo a 50% do comprimento do explante original.
E 7	Explante original entumescido, rachado, com calos em pontuações isoladas em alguns pontos do segmento.
E 8	Parcial descaracterização do explante original por união dos pontos calosos isolados, ocupando 25% do comprimento médio do explante original transformado em tecido não organizado.
E 9	Parcial descaracterização do explante original com mais de 50% do mesmo transformado em massa calosa do tecido não organizado.
E 10	Descaracterização do explante original, completamente transformado em massa calosa de tecido não organizado.

Tabela 6. Notas evolutivas atribuídas comparativamente aos estádios evolutivos dos explantes, para o crescimento e produção de gemas, no decorrer do período experimental.

Nota evolutiva	Descrição do estágio evolutivo Eventos considerados
G 0	Primórdio recém-formado.
G 1	Meristema apical não desenvolvido, de estágio evolutivo semelhante ao de um "seedling", de folhas cotiledonares recém-soltas do tegumento
G 2	Meristema apical entumescido, sem evolução visível do eixo principal e tecidos circunvizinhos a ele também entumescidos.
G 3	Meristema apical entumescido, sem evolução visível do eixo principal, e tecidos circunvizinhos a ele também entumescidos, com primórdios de gema nas epidermes.
G 4	Início de alongamento do eixo principal do meristema apical (1), iniciado com aparecimento das acículas primárias, tecidos entumescidos cotiledonares e hipocotilares próximos ao meristema apical.
G 5	Meristema apical pontiagudo em evolução, com crescimento acentuado do eixo principal, entumescimento dos tecidos cotiledonares e hipocotilares próximos ao meristema apical, crescimento das acículas primárias.
G 6	Meristema apical pontiagudo com crescimento do eixo principal, tecidos hipocotilares e cotiledonares circunvizinhos de aparência normal, sem entumescimento e sem aparecimento de acículas primárias.
G 7	Meristema apical pontiagudo com crescimento do eixo principal, sem entumescimento dos tecidos hipocotilares e cotiledonares próximos ao meristema apical, com início do desenvolvimento das acículas primárias.
G 8	Meristema apical pontiagudo com acentuado desenvolvimento do eixo principal, sem entumescimento dos tecidos hipocotilares e cotiledonares próximos ao meristema apical e acentuado desenvolvimento das acículas primárias.
G 9	Meristema apical pontiagudo, com acentuado desenvolvimento do eixo principal, com entumescimento dos tecidos cotiledonares e hipocotilares próximos ao meristema apical, com acentuado crescimento das acículas primárias.
G 10	Meristema apical pontiagudo, com acentuado desenvolvimento do eixo principal com entumescimento dos tecidos cotiledonares e hipocotilares próximos ao meristema apical, acentuado crescimento das acículas primárias com primórdios de gema na base do eixo principal por modificação das folhas carpelares.

Para facilidade de análise, as notas evolutivas para calo e gema foram agrupadas em classes de 0, 1, 2 e 3, conforme discriminação abaixo:

- Calo

Classe 0: pertencem os explantes de estágio evolutivo similar ao do início da cultura (E0);

Classe 1: pertencem os explantes entumescidos e sem rachadura na epiderme (E1, E2 e E3);

Classe 2: pertencem os explantes entumescidos e com rachaduras na epiderme (E4, E5 e E6), mas sem exibição de tecido caloso através das fissuras recém-abertas;

Classe 3: pertencem os explantes entumescidos com rachaduras, com tecido caloso em pontuações isoladas, em alguns pontos do segmento; explantes entumescidos, com rachaduras na epiderme e tecido caloso em massa composta perfazendo 50% do explante original; e os explantes totalmente descaracterizados e transformados em massa composta de tecido caloso.

- Gema

Classe 0: pertencem os explantes com primórdio de gema recém-formado sobre a sua superfície;

Classe 1: pertencem os segmentos (n^o cotiledonar) com meristema apical não desenvolvido de estágio evolutivo semelhante ao de uma plântula com folhas cotiledonares recém-soltas do tegumento.

Classe 2: pertencem os segmentos com meristema apical não desenvolvidos e com entumescimento dos tecidos circunvizinhos a ele;

Classe 3: pertencem os segmentos com meristema apical não desenvolvidos e com entumescimento dos tecidos circunvizinhos a ele e com primórdios de gema na superfície morfológica; segmentos com meristema apical em evolução, com início do aparecimento das acículas primárias (reunindo as notas dos estádios evolutivos G 4, G 5, G 6 e G 7 desta relação); segmentos com o meristema apical em evolução, com acentuado desenvolvimento das acículas primárias (reunindo as notas dos estádios evolutivos G 8, G 9 e G 10 desta relação).

Em termos de friabilidade, considerou-se os seguintes padrões: **a) vítreo** - explantes de textura brilhante e lisa; e **b) friável** - explantes com textura rugosa apresentando pequenos glomérulos de diâmetro variável, e de aspecto esboroável.

Para a localização e origem do calo, considerou-se a classificação do tecido em que surgiu: **a) origem primária** - quando apareceu diretamente sobre o tecido do explante

original; e b) origem secundária - quando apareceu sobre um tecido desorganizado (calo) que se formou diretamente e, previamente sobre a superfície morfológica do tecido explante.

Juntamente com as notas comparativas de gemas, foram acrescentadas informações quanto à sua cor, seguindo as tonalidades padrões e origens estabelecidas para os calos.

Nas avaliações dos diferentes explantes empregados considerou-se a evolução ou estagnação dos eventos constatados nas avaliações anteriores. Para o caráter formação e produção de gemas, observou-se o número de gemas que apareceram e sua evolução em relação aos diferentes explantes, bem como o número de explantes formando gemas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fase experimental se estendeu por um período efetivo de aproximadamente 24 meses, compreendendo inclusive a considerada no presente trabalho.

Optou-se por este sistema de produção de plântulas, para a obtenção das fontes de explantes, após frequentes insucessos na etapa inicial da instalação da cultura "in vitro".

O emprego das substâncias desinfestantes, na forma e concentração sugeridas por FRANCO & SCHWARZ (1985), aparentemente interferiram na qualidade do processo de germinação das sementes selecionadas para o trabalho. Observou-se acentuada desigualdade entre e dentro das progênes neste processo de germinação, impedindo a obtenção das fontes de explantes em quantidade adequada, de estádios evolutivos similares e sem contaminantes, que possibilitasse, o estabelecimento da pesquisa.

Testes complementares com H_2O_2 e Benlate em concentração e tempo de exposição diferentes, quando aplicados

às sementes escolhidas, também se mostraram inadequados para a obtenção das progênes "in vitro" nas condições necessárias.

4.1. PRODUÇÃO DE CÉLULAS NÃO ORGANIZADAS (CALO)

Nas Tabelas 7, 8, 9, 10, 11 e 12 constam os dados das observações feitas quanto à produção de calo nos diferentes explantes e progênes, evidenciando seus comportamentos durante o período de cultivo.

Para os explantes da extremidade cotiledonar (a 0), verificou-se nos dados da primeira avaliação efetuada e constantes na Tabela 7, que a maior parte destes explantes se concentraram nos estádios iniciais de desenvolvimento, embora as progênes M_1 , M_4 e M_5 , apresentassem explantes em estádios 4 e 5, prenunciando o processo da evolução morfogênica.

Nos resultados das subseqüentes avaliações, (25 e 100 dias) observou-se similar comportamento dos explantes, embora os estádios de diferenciação mais acentuados fossem atingidos neste período, também pelos representantes das mesmas progênes já citadas anteriormente, exibindo exemplares totalmente descaracterizados por massa calosa (Figura 8), enquanto que os representantes das progênes M_2 e M_3 , permaneceram nas fases precedentes (Figura 7).

Tabela 7. Figura demonstrativa do número observado de explantes da extremidade cotiledonar (a.0), nos diferentes estádios evolutivos, para a produção de calo, nas três avaliações realizadas (7, 25 e 100 dias) durante o período de cultivo.

Estádios evolutivos Avaliação e matrizes		não dife- renciado	EM DIFERENCIAÇÃO										Total
			1			2				3			
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
M 1	1. ^a	43	14	-	-	7	-	-	-	-	-	-	64
	2. ^a	5	33	5	1	9	4	-	-	6	-	-	63
	3. ^a	-	1	-	7	7	-	-	-	6	5	5	31
Total		48	48	5	8	23	4	-	-	12	5	5	158
M 2	1. ^a	52	17	5	-	-	-	-	-	-	-	-	74
	2. ^a	16	36	16	5	-	-	-	-	-	-	-	73
	3. ^a	-	11	27	29	-	-	-	-	-	-	-	67
Total		68	64	48	34	-	-	-	-	-	-	-	214
M 3	1. ^a	45	13	9	-	-	-	-	-	-	-	-	67
	2. ^a	4	40	13	10	-	-	-	-	-	-	-	67
	3. ^a	-	12	16	37	-	-	-	-	-	-	-	65
Total		49	65	38	47	-	-	-	-	-	-	-	199
M 4	1. ^a	16	19	30	-	2	-	-	-	-	-	-	67
	2. ^a	5	13	16	29	1	1	-	-	2	-	-	67
	3. ^a	4	8	45	-	-	-	-	-	3	2	-	62
Total		25	40	91	29	3	1	-	-	5	2	-	196
M 5	1. ^a	27	13	1	-	18	2	-	-	-	-	-	61
	2. ^a	22	4	4	-	4	8	2	3	4	7	4	62
	3. ^a	8	5	-	-	1	4	-	-	8	16	9	51
Total		57	22	5	-	23	14	2	3	12	23	13	174

onde: 0 = explantes sem diferenciação; 1 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 1, 2 e 3, para calo; 2 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 4, 5, 6 e 7, para calo; 3 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 8, 9 e 10, para calo; 1^a, 2^a e 3^a = avaliações realizadas durante o cultivo (7, 25 e 100 dias, respectivamente); M 1, M 2, M 3, M 4 e M 5 = diferentes progênies.

Tabela 8. Figura demonstrativa do número observado de explantes cotiledonares próximos ao ápice caulinar (a.l), nos diferentes estádios evolutivos, para a produção de calo, nas três avaliações realizadas (7, 25 e 100 dias) durante o período de cultivo.

Estádios evolutivos Avaliações e matrizes		nao dife- renciado 0	EM DIFERENCIAÇÃO										Total
			1			2				3			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
M 1	1. ^a	14	4	-	-	1	-	-	-	-	-	-	19
	2. ^a	4	9	2	-	2	2	-	-	1	-	-	20
	3. ^a	-	-	-	-	2	1	-	-	6	5	5	19
Total		18	13	2	-	5	3	-	-	7	5	5	58
M 2	1. ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2. ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3. ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 3	1. ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2. ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3. ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 4	1. ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2. ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3. ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 5	1. ^a	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2. ^a	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3. ^a	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Total		5	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-

onde: 0 = explantes sem diferenciação; 1 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 1, 2 e 3, para calo; 2 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 4, 5, 6 e 7, para calo; 3 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 8, 9 e 10, para calo; 1.^a, 2.^a e 3.^a = avaliações realizadas durante o cultivo (7, 25 e 100 dias, respectivamente); M 1, M 2, M 3, M 4 e M 5 = diferentes progênies.

Tabela 9. Figura demonstrativa do número observado de explantes cotiledonares - nós (b 0), nos diferentes estádios evolutivos para a produção de calo, nas três avaliações realizadas (7, 25 e 100 dias) durante o período de cultivo.

Estádios evolutivos Avaliações e matrizes		não diferenciado	EM DIFERENCIAÇÃO										Total
			1			2				3			
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
M 1	1. ^a	8	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	6	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	10
	3. ^a	1	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	6
Total		15	7	2	2	-	-	-	-	-	-	-	26
M 2	1. ^a	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	4	1	5	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	3. ^a	2	2	5	-	-	-	-	-	-	-	-	9
Total		11	8	10	-	-	-	-	-	-	-	-	29
M 3	1. ^a	6	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	3	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	3. ^a	-	7	3	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Total		9	16	5	-	-	-	-	-	-	-	-	30
M 4	1. ^a	7	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	-	7	3	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	3. ^a	-	6	4	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Total		7	16	7	-	-	-	-	-	-	-	-	30
M 5	1. ^a	9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	4	5	-	-	1	-	-	-	-	-	-	10
	3. ^a	1	5	-	-	2	-	-	-	-	-	-	8
Total		14	11	-	-	3	-	-	-	-	-	-	28

onde: 0 = explantes sem diferenciação; 1 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 1, 2 e 3, para calo; 2 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 4, 5, 6 e 7, para calo; 3 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 8, 9 e 10, para calo; 1.^a, 2.^a e 3.^a = avaliações realizadas durante o cultivo (7, 25 e 100 dias, respectivamente); M 1, M 2, M 3, M 4 e M 5 = diferentes progênies.

Tabela 10. Figura demonstrativa do número observado de explantes hipocotilares (c 0) nos diferentes estádios evolutivos para a produção de calo nas três avaliações realizadas (7, 25 e 100 dias), durante o período de cultivo.

Estádios evolutivos Avaliações e matrizes	não dife renciado	EM DIFERENCIAÇÃO											Total
		1			2				3				
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
M 1	1. ^a	6	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	1	4	2	-	1	1	-	-	1	-	-	10
	3. ^a	-	2	2	1	2	-	-	-	1	1	-	9
Total		7	9	4	1	4	1	-	-	2	1	-	29
M 2	1. ^a	3	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	2	1	7	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	3. ^a	-	-	5	3	-	-	-	-	-	-	-	8
Total		5	8	12	3	-	-	-	-	-	-	-	28
M 3	1. ^a	5	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	3	2	3	2	-	-	-	-	-	-	-	10
	3. ^a	-	2	1	4	-	-	-	-	-	-	-	7
Total		8	7	6	6	-	-	-	-	-	-	-	27
M 4	1. ^a	-	3	7	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	-	-	2	7	-	1	-	-	-	-	-	10
	3. ^a	-	-	2	8	-	-	-	-	-	-	-	10
Total		-	3	11	15	-	1	-	-	-	-	-	30
M 5	1. ^a	4	2	-	-	4	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	2	2	-	-	2	-	-	-	2	-	-	8
	3. ^a	-	3	-	-	-	-	-	1	2	1	1	8
Total		6	7	-	-	6	-	-	1	4	1	1	26

onde: 0 = explantes sem diferenciação; 1 = agrupamentos dos explantes nos estádios evolutivos 1, 2 e 3, para calo; 2 = agrupamentos dos explantes nos estádios evolutivos 4, 5, 6 e 7, para calo; 3 = agrupamentos dos explantes nos estádios evolutivos 8, 9 e 10, para calo; 1.^a, 2.^a e 3.^a = avaliações realizadas durante o cultivo (7, 25 e 100 dias, respectivamente); M 1, M 2, M 3, M 4 e M 5 = diferentes progênies.

Tabela 11. Figura demonstrativa do número observado de explantes do hipocótilo (c 1), nos diferentes estádios evolutivos, para a produção de calo, nas três avaliações realizadas (7, 25 e 100 dias) durante o cultivo.

Estádios evolutivos		não diferenciado	EM DIFERENCIAÇÃO										Total	
			1			2				3				
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10
Avaliações e matrizes														
M 1	1. ^a	4	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	2	2	2	2	-	3	1	-	-	-	-	-	12
	3. ^a	-	1	-	1	4	1	-	-	-	-	-	-	7
Total		6	9	2	3	4	2	1	-	-	-	-	-	29
M 2	1. ^a	3	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	2	1	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	3. ^a	-	-	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	8
Total		5	7	12	4	-	-	-	-	-	-	-	-	28
M 3	1. ^a	2	6	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	1	1	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	3. ^a	-	2	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-	9
Total		3	9	10	7	-	-	-	-	-	-	-	-	29
M 4	1. ^a	2	2	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	1	1	2	6	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	3. ^a	-	-	2	7	-	-	-	-	-	-	-	-	9
Total		3	3	10	13	-	-	-	-	-	-	-	-	29
M 5	1. ^a	4	4	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	10
	2. ^a	2	1	-	-	5	-	-	-	-	2	-	-	10
	3. ^a	1	-	3	-	-	-	-	-	-	3	-	-	7
Total		7	5	3	-	7	-	-	-	-	5	-	-	27

onde: 0 = explantes sem diferenciação; 1 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 1, 2 e 3, para calo; 2 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 4, 5, 6 e 7, para calo; 3 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 8, 9 e 10, para calo; 1.^a, 2.^a e 3.^a = avaliações realizadas durante o cultivo (7, 25 e 100 dias, respectivamente); M 1, M 2, M 3, M 4 e M 5 = diferentes progenies.

Tabela 12. Figura demonstrativa do número observado de explantes hipocotilares (c 2) nos diferentes estádios evolutivos, para a produção de calo, nas três avaliações realizadas (7, 25 e 100 dias) durante o período de cultivo.

Avaliações e matrizes	Estádios evolutivos	não diferenciado	EM DIFERENCIAÇÃO										Total
			1			2				3			
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
M 1	1. ^a	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
	2. ^a	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	4
	3. ^a	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	2
Total		3	3	1	-	2	-	-	-	1	-	-	10
M 2	1. ^a	2	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	9
	2. ^a	1	1	6	1	-	-	-	-	-	-	-	9
	3. ^a	-	1	6	1	-	-	-	-	-	-	-	8
Total		3	8	13	2	-	-	-	-	-	-	-	26
M 3	1. ^a	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	4
	2. ^a	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	4
	3. ^a	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Total		-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	12
M 4	1. ^a	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	2. ^a	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	2
	3. ^a	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2
Total		-	1	2	3	-	-	-	-	-	-	-	6
M 5	1. ^a	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2
	2. ^a	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
	3. ^a	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Total		-	1	-	-	3	-	-	-	-	-	-	4

onde: 0 = explantes sem diferenciação; 1 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 1, 2 e 3, para calo; 2 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 4, 5, 6 e 7, para calo; 3 = agrupamento dos explantes nos estádios evolutivos 8, 9 e 10, para calo; 1.^a, 2.^a e 3.^a = avaliações realizadas durante o cultivo (7, 25 e 100 dias, respectivamente); M 1, M 2, M 3, M 4 e M 5 = diferentes progênies.

Analisando-se os dados das avaliações efetuadas e constantes na Tabela 8, verifica-se que os explantes cotiledonares (a 1) e próximos ao nó, apresentaram comportamento similar aos do segmento a 0 já analisado. Observou-se que após 7 dias de cultivo, 9 explantes apenas estavam em início da fase de entumescimento e, que os demais se distribuíram pelos outros padrões evolutivos de estádios mais avançados. Após 25 dias, a maior percentagem dos explantes se situavam nos estádios finais do padrão adotado para calo.

Observa-se pelos dados constantes na Tabela 9 que os segmentos que continham o nó cotiledonar b 0, embora com representantes de todas as progênies, se concentraram nos estádios evolutivos iniciais para os 3 levantamentos realizados, atingindo entretanto o quarto estágio para a produção de calo, mas sem evolução posterior para os estádios finais da classificação adotada.

As Tabelas 10, 11 e 12 apresentam a evolução dos explantes hipocotilares durante o período de cultivo. Na classificação evolutiva atribuída, nota-se que eles apresentaram distribuição similar aos de outros explantes e, os originários das progênies M1, M4 e M5 corresponderam mais rapidamente aos estímulos exógenos, alcançando os estádios finais da classificação. Esta diferença apresentada pelos explantes das progênies M1, M4 e M5, pode ser resultantes dos efeitos genéticos dos próprios explantes.

Nas Tabelas 13, 14 e 15 constam respectivamente as freqüências observadas dos explantes com ocorrência ou não do processo morfogênico, após aplicação do teste de análise estatística, dos dados das avaliações efetuadas aos 7, 25 e 100 dias.

A contagem dos dados em uma amostra composta por 602 segmentos, mostrando uma tendência dos mesmos de se concentrarem no estágio sem diferenciação (E.0), é apresentada na Tabela 13.

Tabela 13. Freqüências observadas para o número de explantes com ocorrência ou não do início do processo morfogênico (calo), após 7 dias de cultivo.

Freqüências Explantes	ND	D	Total
Cot. gema (a.1)	15	3	18
Cot. ponta (a.0)	187	143	330
gema ou nó cotiledonar (b.0)	92	27	129
Hipocot. (c 0, c 1, c 2)	36	99	135
TOTAL	330	272	602

onde: ND = sem manifestação de qualquer processo morfogênico (calo); D = com início da manifestação morfogênica (calo); a.1, b.0, c.0, c 1 e c 2 = diferentes explantes considerados para início da cultura "in vitro" (Figura 3).

Os dados de contagem ao final do período de 7 dias de cultivo das amostras consideradas, no que se refere à produção de calo, foram submetidos ao teste de χ^2 . O valor do χ^2 obtido foi de 73,869, valor este significativo ao nível de 1% de probabilidade.

A concentração dos dados no estágio E.0, sem início aparente do processo morfogênico acredita-se que possa ser atribuída ao pouco tempo decorrido entre a instalação da cultura e as primeiras avaliações (7 dias após). Vários pesquisadores observaram mudanças morfológicas visíveis na superfície do explante, somente após o décimo dia de cultivo (PALTA et alii, 1978; ATIKEN, 1981; MOTT & AMMERSON, 1981; ATIKEN & CHRISTIE, 1984; FRANCO & SCHWARZ, 1985; SMITH, 1986; THORPE & PATEL, 1986).

Para MURASHIGE (1974), o estabelecimento da cultura "in vitro" deve ser realizada através de uma seqüência de passos, visando: a obtenção em quantidade representativa de explantes vivos e livres de contaminantes; ao crescimento do explante e promoção da morfogênese e, finalmente, a obtenção de "plântulas" sobreviventes em condições de campo. Cada um destes estádios considerados apresentam objetivos e necessidades diferentes, que podem ser manejadas através das características do meio nutritivo e do ambiente.

Para a instalação da cultura "in vitro", é enfatizada a necessidade de se considerar o processo de seleção

adequada do explante que, segundo afirmam THORPE & PATEL (1986) é uma operação ainda realizada empiricamente.

As culturas "in vitro" são, geralmente, realizadas através das culturas de calo e de órgãos. Segundo BONGA (1982), DODDS & ROBERTS (1982), GAMBORG (1982) e GEORGE & SHERRINGTON (1984), a cultura de calos pode ser iniciada de qualquer tipo de material explantado e possuidores de células parenquimatosas, capazes de recomeçar o processo de divisão celular e formar uma massa não organizada de células. Esta massa pode ser mantida em ativo crescimento, sem organização, ou através do ambiente, induz-se a diferenciação em raízes ou brotos.

Quando gemas ou brotos são formados de tecido caloso, sua morfogênese é de origem indireta, e pode apresentar alterações na composição cromossômica, favorecendo o aparecimento de mutantes resultantes de uma variação soma-clonal, com conseqüente produção de "plântulas" de genótipo diferente ao do escolhido.

Para a produção de calo tem-se empregado meios semi-sólidos (ágar), de composição nutritiva simples - sais minerais, açúcares, vitaminas e, suplementação com auxina e citocinina.

As auxinas, segundo VALIO (1979), ativas em vários processos fisiológicos (ZAERR, 1982; JACOBSEN, 1983), são

frequentemente usadas para a produção e formação de calos, em bora sua adequada aplicação exógena varie em função da quantidade endógena nas células do tecido explantado e que segundo ZAERR & MAPES (1982), são de níveis frequentemente desconhecidos. Estes níveis endógenos das auxinas são variáveis, em função das flutuações nas velocidades de síntese e sua inativação ou destruição. Nos vegetais, ocorrem naturalmente em órgãos que estão em ativo crescimento (regiões meristemáticas, folhas jovens, coleoptiles e sementes), causando crescimento celular, sendo no entanto naturalmente inativado durante os processos de crescimento e diferenciação. As auxinas sintéticas são as comumente aplicadas exogenamente, à concentrações que variam de 0,01 a 10 mg/l, e as preferidas por serem mais estáveis e permanecerem ativas por período maior no interior dos tecidos, sendo o AIA, AIB, ANA e o 2,4-D, as mais empregadas.

As citocininas, segundo METIVIER (1979) e CASTRO (1985), são promotoras da divisão celular, aumento do tamanho da célula, quebra de dormência em sementes, inibidora de dominância apical ativando o desenvolvimento de gemas e retardando o envelhecimento de alguns tecidos. As principais regiões de síntese deste hormônio são os meristemas radiculares, podendo também serem sintetizados nas partes aéreas, translocando-se livremente, por toda planta através do xilema. As citocininas são aplicadas exogenamente a concentrações que variam de 0,03 a 30 mg/l, e as mais comumente empre-

gadas são a cinetina (cin), benziladenina (BA), zeatina e isopentiladenina (2 ip).

Da interação de ambos (auxina e citocinina), há a ocorrência dos efeitos morfogênicos. Deve-se considerar ainda, o período de exposição dos explantes aos reguladores de crescimento, pois a sua permanência, nos estádios posteriores à indução, podem ter efeitos inibitórios sobre a mesma (REILLY & BROWN, 1976; MOTT & AMMERSON, 1981). Estes autores defendem a teoria do "pulsing", que seria a remoção ou exposição aos estímulos do meio, baseado nos aspectos morfogênicos da própria cultura, e não sob períodos pré-fixados (FRANCO & SCHWARZ, 1985).

As diferenças naturais dos níveis endógenos destes hormônios, nos tecidos vegetais, além de outros fatores fisiológicos e genéticos, BONGA (1982) e GEORGE & SHERRINGTON (1984) asseguram a existência da variabilidade na capacidade dos tecidos vegetais às respostas morfogênicas através de estímulos exógenos. Isto faz com que explantes de diferentes partes da mesma planta possam requerer meios distintos para o crescimento satisfatório (MURASHIGE, 1974; SHARP, 1979; BONGA, 1982; DAVID, 1982; DURZAN, 1984; GEORGE & SHERRINGTON, 1984; FRANCO & SCHWARZ, 1985; THORPE & PATEL, 1986), e que alterações na composição dos meios de cultura são necessárias para obter respostas distintas com relação ao crescimento, pois não existe uma única formulação de meio capaz de manter o cresci-

mento dos diferentes explantes e estádios. Informações de literatura mostram que a composição do meio de MURASHIGE & SKOOG (MS) é a mais freqüentemente empregada.

Para a realização do presente experimento, estas informações foram consideradas, pois explantes cotiledonares foram cultivados em meio MS (8) na presença de ANA (25 nM) e BAP (25 µM), para a fase 2 e sua conseqüente remoção na fase 3. Para os explantes hipocotilares e não cotiledonar, foi empregado o meio básico para *Cupressus*, estabelecido por FRANCO & SCHWARZ (1985), na presença de IBA (5 nM) e BAP (5 µM), para a fase 2.1 e sua conseqüente remoção na fase 3.1. O período de exposição e remoção considerados foram pré-fixados para 25 e 75 dias consecutivamente.

Segundo YEOMAN (1973) e GEORGE & SHERRINGTON (1984) os dados de literatura disponíveis não evidenciam claramente a caracterização do princípio e término da primeira fase de indução da divisão celular, para o segundo período da efetiva divisão com relação ao padrão de crescimento e diferenciação.

Os dados de contagem apresentados na **Tabela 13**, se submetidos a uma comparação grosseira realizada ao final do sétimo dia de cultivo, 45,18% do total dos explantes se apresentaram em início da fase de divisão celular. Desse montante em diferenciação, 23,75% dos explantes correspondem aos explantes cotilédone ponta (a 0 - representando 43,33% do to-

tal de explantes cotilédones ponta cultivados). Seqüencialmente, pode-se observar que dessa massa total em diferenciação, 16,44% correspondem aos explantes hipocotilares (c 0, c 1 e c 2 - representando 73,33% do total de explantes hipocotilares cultivados). Em seguida temos o segmento gema representando 4,48% deste total em diferenciação (b 0 - correspondendo a 22,69% do total de explantes nã cotiledonares cultivados) e, finalmente, temos que 0,49% deste total correspondem aos explantes cotilédones próximo à gema (a 1 - representando 16,66% do total de explantes cotilédone-gema cultivados).

Ao se observar, a quantidade amostrada em cada tipo de explante, veremos que desta massa total de 602 representantes, 330 explantes correspondem ao cotilédone ponta (54,82% do total amostrado) e, nesta primeira avaliação, 56,67% de seus representantes não estavam em diferenciação celular. Desta amostra global, temos que 135 explantes correspondem aos explantes hipocotilares (22,42% do total amostrado) e, nesta avaliação, apenas 26,67% de seus representantes não estavam em diferenciação celular. Ainda considerando esta mesma forma de raciocínio, observamos que 119 destes explantes correspondem ao explante gema (nã cotiledonar b 0 e 19,77% do total amostrado) e, 77,31% dos explantes representantes desta classe, não estavam em visível diferenciação celular e, finalmente, temos que 18 explantes desta amostra global correspondem aos explantes cotiledonários próximos à gema (a 1 - 2,99% do total amostrado), sendo que 83,33% dos explantes represen-

tantes desta classe, não estavam em visível diferenciação celular.

Considerando os dados da **Tabela 13**, observou-se ainda que, os explantes hipocotilares corresponderam mais prontamente ao início do processo de diferenciação, seguido pelos explantes cotilédones ponta, não cotiledonar e por último, o cotilédone próximo à gema.

Deste conjunto, observa-se que do total amostrado (602 explantes) e que se encontra com início de manifestação morfogênica (272 explantes), o maior número de segmentos em morfogênese, 88,97% do total em diferenciação, correspondem aos explantes que se localizam distantes do não cotiledonar ou do meristema apical.

Este comportamento dos diferentes explantes em relação ao caráter produção de calo, neste primeiro período avaliado (7 dias), podem ser resultantes de fatores endógenos e inerentes ao tipos dos explantes considerados (**Tabelas 7, 10, 11 e 12**).

Numa segunda observação, os dados obtidos foram submetidos ao teste de χ^2 e o valor foi de 47,812, mostrando diferenças estatísticas significativas ao nível de 1% de probabilidade. Estes dados, referem-se à característica dos explantes que estavam ou não em diferenciação morfogênica (calo) após 25 dias de cultivo, constantes na **Tabela 14**. Nesta fase, foi observada uma concentração maior dos indivíduos no

estádio evolutivo com a morfogênese em manifesto. Apenas 20,43% dos explantes amostrados permaneceram no estágio evolutivo do início da cultura, ou seja, sem qualquer modificação visual.

Tabela 14. Freqüências observadas para o número de explantes com ocorrência ou não de processo morfogênico (calo), após 25 dias de cultivo.

Explantos	Freqüências	ND	D	Total
Cot. gema (a.1)		3	15	18
Cot. ponta (a.0)		49	281	330
Gema ou nó cotiledonar (b.0)		53	71	124
Hipocótilo (c.0, c.1, c.2)		19	116	135
TOTAL		124	483	607

onde: ND = sem manifestação de qualquer processo morfogênico (calo); D = com início de manifestação morfogênica (calo); a.1, a.0, b.0, c.0, c.1 e c.2 = diferentes explantes considerados para início da cultura "in vitro" (Figura 3).

Da massa total proliferante, ao final de 25 dias de cultivo, 483 explantes estavam em processo de diferenciação celular visual, para a produção de calo. Este total corresponde a 79,57% da amostra de explantes obtidos e destes, a parcela de maior representatividade corresponde aos ex

plantes cotil-ponta (a.0) com 46,29% dos explantes em desenvolvimento; seqüencialmente os explantes hipocotilares (c.0, c.1 e c.2) com 19,10% em desenvolvimento, seguidos pelo explante não cotiledonar (b.0) com 11,70% em diferenciação e finalmente o explante cotilédone próximo à gema (a.1) com 2,47% em diferenciação, completando os representantes em desenvolvimento.

Do total amostrado neste levantamento (607 explantes) com visível ou não manifestação do caráter morfogenico, 330 exemplares (54,36% da amostra total) correspondem ao cotilédone-ponta (a.0), e dentro de sua classificação, apenas 49 explantes não estavam em desenvolvimento morfogenico, representando 14,85% dos explantes da sua categoria.

Seqüencialmente, temos os explantes hipocotilares com 135 exemplares (c.0, c.1 e c.2), representando 22,24% da amostra global e, dentro de sua classificação de explante, apenas 19 exemplares (14,07%) não estavam com visível manifestação morfogenica. Para os explantes (20,43% da amostra total), apenas 53 exemplares de sua categoria não estavam em visível diferenciação (42,74%), portanto, quase que a metade de seus exemplares aparentemente não estavam em produção de calo. Finalmente, para os explantes cotiledonários próximos à gema (a.1), dos 18 explantes existentes em sua classificação (2,96% do total amostrado) apenas 3 (16,67%) não estavam em morfogênese.

Deste conjunto, observa-se que do total amostrado (607 exemplares) e que se encontravam com manifestação morfogênica (483 explantes), o maior número de segmentos em morfogênese, continua correspondendo aos explantes que se localizam distantes do nó cotiledonar (b.0) ou do meristema apical, perfazendo um montante de 82,19% do total em diferenciação.

Numa terceira avaliação os dados obtidos foram submetidos ao teste de χ^2 e o valor foi de 181,423, mostrando diferenças estatísticas significativas ao nível de 1% de probabilidade. Estes dados referem-se à característica dos explantes que estavam ou não em diferenciação morfogênica (calo) decorridos os 100 dias de cultivo (**Tabela 15**). Nesta fase, foi observada a concentração dos explantes amostrados quase que exclusivamente no estágio evolutivo com a morfogênese em manifesto, com apenas 8,33% dos explantes amostrados permanecendo no estágio evolutivo do início da cultura, ou seja, sem qualquer modificação visível e pertencentes à categoria explante gema ou nó cotiledonar.

Da massa total proliferante, ao final dos 100 dias de cultivo, 495 explantes estavam em processo de diferenciação celular visível para produção de calo. Este total corresponde a 91,67% da amostra de explantes obtidas, e destes, a parcela de maior representatividade corresponde ao explante cotilédone-ponta (a.0) com todos os explantes em desenvolvi-

mento e representando 59,39% deste total proliferante e 54,44% do total amostrado neste levantamento final. Em seguida foi encontrado para os explantes hipocotilares com todos os explantes em desenvolvimento, e representando 23,5% do total em diferenciação e 21,48% do total amostrado neste levantamento final. Posteriormente, temos os explantes não-cotiledonares com 14,14% do total em desenvolvimento e 12,96% do total amostrado e, finalmente, o cotilédone próximo  gema (a.1) com todos os exemplares em diferenciação e representando 2,77% da amostra global e 3,03% da massa em desenvolvimento.

Tabela 15. Freqncias observadas para o número de explantes com ocorrência ou não do processo morfogênico (calo), após 100 dias de cultivo.

Explantes \ Freqncias	ND	D	Total
Cot. gema (a 1)	0	15	15
Cot. ponta (a 0)	0	294	294
Gema ou não cotiledonar (b 0)	45	70	115
Hipocótilo (c 0, c 1, c 2)	0	116	116
TOTAL	45	495	540

onde: ND = sem manifestao de qualquer processo morfogênico (calo); D = com início da manifestao morfogênica (calo); a 1, a 0, b 0, c 0, c 1 e c 2 = diferentes explantes considerados para início da cultura "in vitro" (Figura 3).

Destes três levantamentos (Tabelas 13, 14 e 15) foi observado que o período que apresentou atividade morfogênica (calo) com maior proporção foi nos 25 primeiros dias, pois foi grande a diferença na percentagem de explantes em processo morfogênico, após o sétimo dia de cultivo (34,39%) embora este período tenha se evidenciado insuficiente para a manifestação visível do caráter. Em todos os levantamentos efetuados (7, 25 e 100 dias) foi observado que os percentuais da classe de explante com maior número de exemplares em produção de calo, foram os situados distantes do meristema apical ou do não-cotiledonar; 88,97%; 82,19% e 82,83%, respectivamente.

Os explantes pertinentes à extremidade cotiledonar, para os três levantamentos efetuados contribuíram com o maior número de exemplares na massa morfogênica. A diferença nos dados, entre o primeiro (7 dias) e o segundo (25 dias) levantamentos realizados, para estes explantes que estavam em produção morfogênica foi de 22,54%, contribuindo com 143 explantes, ou seja, 52,57% no primeiro levantamento efetuado, e com 281 (58,17%) para o segundo e, pouco variou (294 explantes) em relação ao terceiro (100 dias) demarcando talvez o início da fase qualitativa (formação de gemas, filóides, etc).

Considerando ainda, os principais tipos de explantes que rapidamente contribuíram com maior percentual na massa em morfogênese, temos os explantes hipocotilares com 99 explantes em morfogênese (36,40% do total em diferenciação)

ao final do sétimo dia de cultivo, passaram para 116 em evolução (24,02% do total em desenvolvimento) ao final dos 25 dias de cultivo, apresentando uma diferença, embora com representatividade menor em relação aos explantes extremidades cotiledonares, de apenas 3,0% em relação ao total avaliado. Os demais explantes apresentaram semelhança no comportamento, porém em intensidades menores.

Confirmando a opinião de vários autores, esta constância na diversidade das respostas dos diferentes explantes em relação à produção de calo, acredita-se estar associada às características próprias de cada tipo de explantes e de sua origem. As diferentes concentrações endógenas dos hormônios nas plântulas, resultante da sua translocação interna, bem como o recente estado pós-germinado da mesma, permite que haja a possibilidade de que grande parte de suas características morfogênicas sejam também orientadas pelas substâncias maternas residuais no interior das progênies.

GAMBORG (1982), DODDS & ROBERTS (1982), GEORGE & SHERRINGTON (1984), afirmam ser possível o estabelecimento de uma cultura de calo de praticamente qualquer planta e da maioria de suas partes, empregando um meio nutritivo simples, acrescido de auxinas e citocininas e, que a textura e morfologia do calo, manipulada pelas variações nas constituintes do meio nutritivo, produzindo calos macios, friáveis e úmidos (com células grandes e vacuoladas) em meio de alta concentra-

ção de auxina e baixa de citocinina e, se a relação é inversa, produz calos de tecido compacto secos e com células pequenas.

As células constituintes dos calos são desuniformes, com variação na forma, tamanho e características da parede celular, inclusões citoplasmáticas, grau de vacuolação (organelas celulares que segundo BANDEL, 1979 podem induzir a diferentes tipos de manifestação morfogênicas), de núcleo proeminente e de grande diversidade do número de cromossomos. Os calos se tornam amarelados, brancos, verdes ou pigmentados com antocianina e, ainda exibem a citodiferenciação nos elementos traqueídeos e crivosos, suberizados, que formam meristêmios ou nódulos vacuolados e que podem se transformar em centros de formação de ápices ou brotos, primórdios de raízes ou embriões (Figuras 6, 11, 12 e 13), conforme observado também, neste trabalho de pesquisa.

Com relação às passagens e subcultivos DODDS & ROBERTS (1982) sugerem que a cultura em meio semi-sólido, e em temperaturas superiores a 25°C, não permaneçam por períodos superiores de 4 - 6 semanas no mesmo meio e que o subcultivo seja realizado a uma densidade aproximada de 5 - 10 mm de diâmetro ou 20 - 100 mg a cada 28 dias. O material trabalhado na presente pesquisa foi transferido para meio fresco e sem regulador de crescimento aos 25 dias, sofrendo na maioria dos explantes o processo da "repicagem" ou subcultura.

As temperaturas no interior da câmara de crescimento durante o período da fase experimental, conforme dados da **Tabela 2** apresentaram amplitude média de variação de $2,33^{\circ}\text{C}$ em temperatura média diurna de $28,27^{\circ}\text{C}$ e noturna de $25,94^{\circ}\text{C}$, dentro dos limites satisfatórios para a cultura (BONGA, 1982; GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

DODDS & ROBERTS (1982), afirmaram ainda que bons calos devem aparecer dentro de um período de 30 dias, podendo ocorrer variações dentro do mesmo experimento e que suas características de crescimento estão relacionadas com as condições de cultivo. Em explantes do xilema removido das vizinhanças do câmbio vascular, a maior parte dos derivados do câmbio se dividem e formam extensivos calos; quando retirado do tecido da região central das raízes, resultam apenas em calos isolados nas extremidades dos vasos, enquanto explantes do floema, vizinhos ao câmbio vascular, produzem crescimentos mais vigorosos.

Considerando a existência de 3 estádios evolutivos para a produção de células não organizadas, onde, segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984), o primeiro estágio se caracteriza pela indução da divisão celular; o segundo estágio, um período de efetiva divisão celular, durante o qual células não diferenciadas ou não organizadas se redividem; e um terceiro estágio, período em que a divisão celular diminui ou cessa, e quando dentro da massa não organizada aumenta a diferenciação celular, confirmando relato de DODDS & ROBERTS (1982),

que o crescimento acentuado na massa calosa, acontece entre 4 e 28 dias, e podendo atingir o peso máximo de 1000 mg.

Nos dados da Tabela 16, observa-se para esta característica (produção de calos), que os explantes exibiram aumento na percentagem de matéria seca em relação à fresca, com a evolução do estágio de diferenciação. Este aumento sugere crescimento celular, e possíveis células de vacúolos menores e com entrusões citoplasmáticas, como citam DODDS & ROBERTS (1982), na citodiferenciação.

Tabela 16. Quadro demonstrativo das médias dos pesos frescos e secos (g) e percentuais médios de umidade e de matéria seca dos diferentes explantes dentro das classes evolutivas adotadas.

Identif. Trat. UL.		0	1	2	3
a 0	PF	0,0250	0,0032	0,0056	0,0040
	PS	0,0066	0,0004	0,0011	0,0013
	%U	71,2414	85,3167	80,1275	62,7500
	%MS	28,7586	14,4467	19,8675	37,5800
a 1	PF	0,0055	0,0031	0,0038	0,0058
	PS	0,0012	0,0005	0,0011	0,0038
	%U	78,7334	80,2100	31,8525	78,2300
	%MS	21,2632	19,7800	68,1375	21,7700
b 0	PF	0,1230	-	0,0174	0,0374
	PS	0,0183	-	0,0036	0,0089
	%U	84,4701	-	81,0875	73,4300
	%MS	15,5302	-	18,9000	26,5700
c 0	PF	0,0821	0,0073	0,0104	0,0230
	PS	0,0104	0,0012	0,0025	0,0038
	%U	86,8780	82,2700	73,5075	70,3600
	%MS	13,1220	17,7167	26,4900	29,6300
c 1	PF	0,0819	0,0067	0,0119	0,0278
	PS	0,0117	0,0011	0,0024	0,0080
	%U	84,9706	84,0033	80,1975	70,9400
	%MS	15,0294	15,9933	19,7950	29,0600
c 2	PF	0,0327	0,0096	0,0104	0,0191
	PS	0,0041	0,0026	0,0030	0,0053
	%U	84,5875	72,9333	71,8875	74,4100
	%MS	15,4124	27,0600	28,1075	25,5800
Média Total	PF	0,3502	0,0299	0,0595	0,0823
	PS	0,0523	0,0058	0,0137	0,0251
	%U	81,8135	80,9467	69,7767	71,5000
	%MS	18,1860	18,9993	30,2162	28,5400

onde: 0 = explantes de estágio evolutivo similar ao início da cultura; 1 = reunião dos estádios evolutivos (E1, E2 e E3); 2 = reunião dos estádios evolutivos (E4, E5 e E6); 3 = reunião dos estádios evolutivos (E7, E8 e E9 e E10); a 0, a 1, b 0, c 0, c 1, c 2 = os diferentes explantes (Figura 3).

4.2. PRODUÇÃO DE CÉLULAS ORGANIZADAS (GEMAS)

Aplicando-se o teste do χ^2 aos dados das **Tabelas 17, 18 e 19**, evidenciou que os explantes em diferenciação, mostraram diferenças estatísticas significativas ao nível de 1% de probabilidade.

Obtiveram-se os valores de $\chi^2 = 18,802$; 57,30 e 83,64, respectivamente, quando os dados de contagem de produção de gemas ao final de 7, 25 e 100 dias de cultivo, foram submetidos ao teste.

Para o levantamento efetuado com 7 dias de cultivo, observou-se certa tendência dos explantes em diferenciação de se concentrarem no estágio inicial de seu desenvolvimento. Este fato pode ser observado nos dados da **Tabela 17**, para uma amostra composta de 272 segmentos, podendo talvez ser atribuído ao pouco tempo decorrido entre a instalação da cultura e o primeiro levantamento efetuado.

Esta tabela permitiu observar que 62% dos explantes amostrados se encontravam sem manifestações morfogênicas visíveis.

Desta percentagem a maior parcela pertence aos representantes das extremidades cotiledonares com 26,84% dos seus explantes sem presença visível de gemas; seguidos pelos explantes hipocotilares com 25,73%; pelos exemplares do nó co

tiledonar com 8,82% e, finalmente, pelos segmentos cotiledonares próximos à gema com 0,73%

Tabela 17. Frequências observadas para os explantes com ocorrência ou não de processo morfogênico (gema), após 7 dias de cultivo.

Explantes	Frequências		
	ND	D	Total
Cot. gema (a 1)	2	1	3
Cot. ponta (a 0)	73	70	143
Gema ou não cotiledonar (b 0)	24	3	27
Hipocótilo (c 0, c 1 e c 2)	70	29	99
TOTAL	169	103	272

onde: ND = sem manifestação do processo morfogênico; D = com início de manifestação morfogênica (gema); a 1, a 0, b 0, c 0, c 1, c 2 = diferentes explantes considerados para início da cultura "in vitro" (**Figura 3**).

Na **Tabela 17**, a maior parcela dos explantes em diferenciação, pertence aos representantes das extremidades cotiledonares com 25,73%, seguido pelos segmentos hipocotilares com 10,66%, pelos exemplares do não cotiledonar com 1,13% e, finalmente, os segmentos cotiledonares próximos à gema com 0,37%. Esta tendência de distribuição dos explantes em relação às características morfogênicas, continua evidenciando a possibilidade das regiões meristemáticas ou dos segmentos próximos à eles, de estarem sob efeitos endógenos de fito hormônios, coibindo a indução morfogênica exógena.

Para as observações realizadas aos 25 dias de cultivo, analisando-se os dados da **Tabela 18**, para o caráter organogênese (gema), observa-se que de uma população de 483 explantes, 45% destes (219) permaneceram nos estádios iniciais não visíveis da diferenciação, enquanto 34,78% (168) manifestaram os processos morfogênicos iniciais e 19,87% (96) se apresentaram em estádios mais avançados. Dos explantes que permaneceram dentro da classificação ND adotada (219), encontram-se os explantes das extremidades cotiledonares com 63,47% destes e 28,78% da amostra total; seqüencialmente tem-se: nós cotiledonares com 19,63% destes e 8,90% da amostra total; os explantes hipocotilares com 11,42% destes e 5,17% total e, finalmente, encontram-se os segmentos cotiledonares próximos ao nó com 5,48% destes e 2,48% do total.

Para a classificação D, em que se encontram os explantes com início de processo organogênico (168) os que contribuíram com maior número de explantes foram as extremidades cotiledonares com 45,24% destes, seguido pelos explantes hipocotilares com 38,70%, pelos segmentos do nó cotiledonar com 14,88% e, finalmente, pelos segmentos cotiledonares próximos ao nó com 1,20%.

Na classificação G desta tabela, em que se encontram os explantes com processo organogênico mais acentuado (96 explantes), o segmento representando maior número é a extremidade cotiledonar (a 0) com 68,75% destes, seguido pelos

segmentos hipocotilares com 27,08%, e na percentagem restante ficaram alojados os segmentos do n^o cotiledonar com 3,12% e os segmentos cotiledonares pr^oximos a ele (1,04%).

Tabela 18. Frequências observadas para os explantes com ocorrência ou não do processo morfogênico (gema) após 25 dias de cultivo.

Explantes	Frequências			
	ND	D	G	Total
Cot. gema (a 1)	12	2	1	15
Cot. ponta (a 0)	139	76	66	281
Gema ou n ^o cotiledonar (b 0)	43	25	3	71
Hipocótilo (c 0, c 1, c 2)	25	65	26	116
TOTAL	219	168	96	483

onde: ND = sem manifestação do processo morfogênico; D = com início da manifestação morfogênica (gema); G = com gemas vegetais bem desenvolvidas; a 1, a 0, b 0, c 0, c 1, c 2 = diferentes explantes considerados para início da cultura "in vitro" (Figura 3).

Para as observações realizadas aos 100 dias de cultivo, analisando-se os dados da **Tabela 19**, para o caráter organogênese (gema), observamos que de uma população de 495 explantes, apenas 13,33% (66) não manifestaram início de processo organogênico; 162 encontravam-se em início do processo (33,72%) e a maior parcela já se encontravam nos estádios mais evoluídos, 53,94% (267 explantes). Dos explantes que permaneceram dentro da classificação ND adotada ou sem início aparen

te de organogênese (66), encontram-se em maiores percentagens os explantes das extremidades cotiledonares (50% destes), seguido pelos explantes do nó cotiledonar (27,27% destes) e, finalmente, os segmentos hipocotilares (22,73%). Para a classificação D, ou seja, os explantes em início de processo organogênico (162) os segmentos que contribuíram com maior número são os das extremidades cotiledonares com 39,51% destes (12,93% do total), seguido pelos explantes hipocotilares com 31,48% (10,30% do total), pelos explantes do nó cotiledonar com 27,16% (8,89% do total) e, finalmente, pelos segmentos cotiledonares (a 1) próximos ao nó com 1,85% destes e 0,61% do total. Para a classificação G, ou seja, os explantes com gemas em desenvolvimento (267), os segmentos que contribuíram com maior quantidade de representantes neste estágio foram os da extremidade cotiledonar com 73,78% destes e 39,79% do total, seguido pelos segmentos hipocotilares com 18,73% destes e 10,10% do total; pelos explantes próximos ao nó cotiledonar com 4,49% destes e 2,42% do total e, finalmente, os explantes do nó cotiledonar com 2,99% destes e 1,62% do total.

De maneira geral, pode-se observar para o caráter organogênese (gema), que os explantes que também foram retirados dos locais distantes do meristema apical apresentaram melhores respostas ao caráter, no período de cultivo avaliado. Observa-se que os maiores percentuais de explantes em diferenciação foram obtidos após 7 dias de cultivo no contínuo processo morfogênico (103 aos 7 dias, 264 aos 25 e 429 aos 100 dias.

Tabela 19. Freqüências observadas para os explantes com ocorrência ou não de processo morfogênico (gema) após 100 dias de cultivo.

Explantes \ Freqüências	ND	D	G	Total
Cot. gema (a 1)	0	3	12	15
Cot. ponta (a 0)	33	64	197	294
Gema ou não cotiledonar (b 0)	18	44	8	70
Hipocótilo (c 0, c 1, c 2)	15	51	50	116
TOTAL	66	162	267	495

onde: ND = sem manifestação do processo morfogênico; D = início da manifestação morfogênica (gema); G = com gemas vegetais bem desenvolvidas; a 1, a 0, b 0, c 0, c 1, c 2 = diferentes explantes considerados para início da cultura "in vitro" (Figura 3).

Estes dados confirmam resultados obtidos por MEHRA-PALTA et alii (1978), MOTT et alii (1981), AMERSON et alii (1985), FRANCO & SCHWARZ (1985) e SMITH (1986), quando trabalharam com explantes cotiledonares e hipocotilares de *Pinus taeda*, *P. radiata* e *P. oocarpa* e conseguiram a indução de numerosas gemas adventícias que se tornaram visíveis após 5 semanas. Estes autores afirmaram que os cotilédones tornavam-se grossos e frescos após o período de 2 a 3 semanas para formação de gemas adventícias e que estas também poderiam ser induzidas em explantes hipocotilares, embora em freqüência e intensidade de formação menores que nos cotilédones.

Muito embora o período de observação (100 dias) tenha sido suficientemente extenso para avaliar a organogênese nos diferentes explantes, período maior seria recomendado, para que permitisse confirmar a continuidade do processo organogênico, para os tipos de explantes que apresentaram grandes respostas morfogênicas (extremidade cotiledonar a 0 e os segmentos hipocotilares).

As condições ambientais e químicas em que se desenvolveram as culturas foram satisfatórias conforme informações de literatura (MURASHIGE, 1974; SHARP, 1979; SOMMER & BROWN, 1979; AITKEN et alii, 1981; MOTT & AMERSON, 1981; BONGA, 1982; DAVID, 1982; DURZAN, 1984; AITKEN & CHRISTIE, 1984; GEORGE & SHERRINGTON, 1984; FRANCO & SCHWARZ, 1985; AMERSON et alii, 1985; THORPE & PATEL, 1986) e os dados são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

As culturas do presente trabalho, atingiram o estágio II segundo MURASHIGE (1974), em que objetivava ao crescimento do órgão inoculado, promoção de condições favoráveis ao processo morfogênico e que pudessem após o estágio III se transformarem em "plântulas".

4.3. SOBREVIVÊNCIA

Aplicando-se o teste de χ^2 aos dados das Tabelas 20 e 21, evidenciou-se que o comportamento dos explantes, dentro do caráter sobrevivência, não mostrou diferenças significativas para as análises dos dados obtidos aos 7 e 25 dias de cultivo. Os dados do levantamento efetuado aos 100 dias, (Tabela 22), quando submetidos aos testes, forneceram $\chi^2 = 48,171$, altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Estes dados evidenciaram para os 25 primeiros dias, que as condições fisiológicas dos explantes (Tabelas 3 e 4), as condições ambientais (Tabela 2) e nutricionais (Tabela 1), foram adequadas para a sobrevivência, contínuo crescimento e diferenciação dos explantes (Tabelas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19).

Sabe-se que no preparo do explante para a instalação da cultura "in vitro", o processo da desinfestação deve ser eficiente para liberá-lo de contaminantes e não tão severo que danifique a sua atividade fisiológica.

Tabela 20. Frequências observadas para os explantes vivos após 7 dias de cultivo.

Explantes \ Frequências	S
Cot. gema (a 1)	17
Cot. ponta (a 0)	331
Gema ou nó cotiledonar (b 0)	120
Hipocótilo (c 0, c 1, c 2)	136
TOTAL	604

onde: S = sobreviventes; a 1, a 0, b 0, c 0, c 1 e c 2 = diferentes explantes considerados para o início da cultura "in vitro" (Figura 3).

Tabela 21. Frequências observadas para os explantes sobreviventes após 25 dias de cultivo.

Explantes \ Frequências	NS	S	Total
Cot. gema (a 1)	0	17	17
Cot. ponta (a 0)	22	308	330
Gema ou nó cotiledonar (b 0)	9	115	124
Hipocótilo (c 0, c 1, c 2)	9	127	136
TOTAL	40	567	607

onde: NS = não sobrevivente ou crescimento paralizado; S = sobrevivente; a 1, a 0, b 0, c 0, c 1, c 2 = diferentes explantes considerados para início da cultura "in vitro" (Figura 3).

Semelhante cuidado, foi observado no processo de instalação da cultura, bem como na densidade de inoculação, pois os explantes devem possuir dimensões que possibilitem a sobrevivência e a diferenciação "in vitro" (Tabelas 2 e 3), como salientam MURASHIGE (1974), DODDS & ROBERTS (1982), GEORGE & SHERRINGTON (1984) e THORPE & PATEL (1986).

A Tabela 22, apresenta a contagem dos dados em uma população composta por 538 explantes, mostrando uma tendência dos mesmos a se concentrarem nos de maior sobrevivência. Os dados de contagem no final do período de 100 dias de cultivo, no que se refere à sobrevivência, foram submetidos ao teste de χ^2 , que resultou em alta significância. Para o total sobrevivente de 363 (67,47%), os segmentos com maior número de exemplares são os da extremidade cotiledonar com 61,71% destes e 41,64% do total, seguidos pelos exemplares do nó cotiledonar com 20,94% destes e 14,13% do total, pelos segmentos do hipocótilo com 13,77% destes e 9,29% do total e, finalmente, pelo segmento cotiledonar próximo ao nó com 3,58% destes e 2,42% do total.

Observa-se que para quase todos os tipos de explantes a percentagem dos sobreviventes foi superior a 50%, com exceção dos segmentos hipocotilares que apresentaram uma percentagem de sobrevivência de 42,37% dentro de seu tipo. Os demais, como os representantes com o nó cotiledonar com 67,86%, extremidade cotiledonar com 76,20% e os segmentos cotiledona-

res próximo ao n^o cotiledonar com 92,85%. Estes dados evidenciam que as atividades de subcultivo podem ter influenciado nos processos fisiológicos dos mesmos, acarretando-lhes a morte, visto a permanência das condições ambientais.

Tabela 22. Frequências observadas para os explantes vivos após 100 dias de cultivo.

Explantes	Frequências		
	NS	S	Total
Cot. gema (a 1)	1	13	14
Cot. ponta (a 0)	70	224	294
Gema ou n ^o cotiledonar (b 0)	36	76	112
Hipocótilo (c 0, c 1, c 2)	68	50	118
TOTAL	175	363	538

onde: NS = não sobrevivente ou crescimento paralizado; S = sobrevivente; a 1, a 0, b 0, c 0, c 1, c 2 = diferentes explantes considerados para início da cultura "in vitro" (Figura 3).

4.4. SUPERFÍCIE MORFOLÓGICA DE DIFERENCIAÇÃO

A superfície morfológica de diferenciação tem sido objeto de estudos de vários pesquisadores, e a escolha dos explantes tem sido realizada empiricamente, fazendo com que o número de brotos formados variem com os mesmos. Estas observações foram feitas por THORPE & PATEL (1986), em experi

mentos com vários explantes juvenis de *Pinus contorta* Land., *Pinus rígida* Mull., *Pinus radiata* D. Don., *Picea glauca* Voss., *Picea mariana* B.S.P. e *Picea engelmannii* Parry.

Em estudos morfo-histológicos comparativos feitos no local de iniciação dos brotos em crescimento de explantes embriônicos, cotiledonares e hipocotilares, das espécies acima, revelaram, segundo estes autores, que a despeito dos diferentes locais e tempo de iniciação da formação dos brotos, o seu padrão de desenvolvimento foi similar e que em todas as espécies estudadas, meristemóides conduziram a formação de primórdios de gema e brotos adventícios. Estes eventos ocorrem na ausência de simultânea formação de calo, nas regiões do tecido na qual as células foram ativadas e aparentemente influenciadas, pelos gradientes fisiológicos das substâncias em movimento do meio para o interior da célula.

Para as condições do presente experimento, ao aplicar o teste de χ^2 aos dados das **Tabelas 23, 24 e 25**, evidenciou-se que o comportamento dos explantes, dentro do padrão de diferenciação, na sua superfície morfológica mostraram diferenças significativas para os mesmos, ao nível de 1% de probabilidade, somente para os dados das **Tabelas 24 e 25**. Os dados de contagem ao final de 7, 25 e 100 dias de cultivo, das amostras no que se refere à rugosidade na superfície morfológica de diferenciação, submetidos ao teste, obteve-se os seguintes valores de χ^2 : 0,826; 71,00 e 108,66, respectivamente.

Para o levantamento efetuado aos 7 dias após o cultivo (Tabela 23), observa-se que os explantes, quase que na sua totalidade, se apresentam com superfície lisa, com exceção de 1 explante de extremidade cotiledonar que já apresentava rugosidade superficial. O valor de χ^2 (0,826) para este levantamento não foi significativo, reafirmando a insuficiência deste espaço de tempo, para a ocorrência visível dos eventos morfológicos.

Para as observações realizadas aos 25 dias de cultivo, apenas 175 explantes apresentavam rugosidade superficial, 28,78% do total avaliado, e os demais permaneciam com a superfície aparentemente lisa. Destes explantes, os que se apresentavam em percentagem maior foram os de extremidade cotiledonar com 77,71% (22,37% do total) e, seqüencialmente encontramos os explantes do nó cotiledonar com 18,28% (5,26% do total) enquanto os demais tipos de explantes se apresentaram com menos de 1% de segmentos com rugosidade superficial. Os dados evidenciaram ser este período de tempo ainda insuficiente para melhor visibilidade das manifestações morfogênicas.

Tabela 23. Freqüências observadas para alterações (rugosidade) na superfície morfológica dos explantes após 7 dias de cultivo.

Explantes \ Freqüências	L	R	Total
Cot. gema (a 1)	18	0	18
Cot. ponta (a 0)	330	1	331
Gema ou não cotiledonar (b 0)	120	0	120
Hipocótilo (c 0, c 1, c 2)	135	0	135
TOTAL	603	1	604

onde: L = lisa; R = rugosa ou nodular; a 1, a 0, b 0, c 0, c 1, c 2 = diferentes explantes considerados para início da cultura "in vitro" (Figura 3).

Tabela 24. Freqüências observadas para as alterações (rugosidade) na superfície morfológica dos explantes, após 25 dias de cultivo.

Explantes \ Freqüências	L	R	Total
Cot. gema (a 1)	15	3	18
Cot. ponta (a 0)	194	136	330
Gema ou não cotiledonar (b 0)	92	32	124
Hipocótilo (c 0, c 1, c 2)	132	4	136
TOTAL	433	175	608

onde: L = lisa; R = rugosa ou nodular; a 1, a 0, b 0, c 0, c 1, c 2 = diferentes explantes considerados para início da cultura "in vitro" (Figura 3).

Tabela 25. Freqüências observadas para as alterações (rugosidade) na superfície morfológica dos explantes, após 100 dias de cultivo.

Explantes	Freqüências		
	L	R	Total
Cot. gema (a 1)	3	12	15
Cot. ponta (a 0)	123	171	294
Gema ou nó cotiledonar (b 0)	74	38	112
Hipocótilo (c 0, c 1, c 2)	110	7	117
TOTAL	310	228	538

onde: L = lisa; R = rugosa ou nodular; a 1, a 0, b 0, c 0, c 1, c 2 = diferentes explantes considerados para início da cultura "in vitro" (**Figura 3**)

Esta característica de rugosidade superficial, em explantes de coníferas, parece ser fator que precede aos acontecimentos morfológicos de organogênese. Vários autores, MEHRA-PALTA & SMELTZER (1978), MOTT & AMERSON (1981), FRANCO & SCHWARZ (1985), SMITH (1986) e THORPE & PATEL (1986), observaram que após o período de 14 a 21 dias os explantes cotiledonários tornaram-se grossos, frescos e brilhantes, com toda a superfície tornando-se áspera e succulenta, de perfis abobadados, e que após 5 semanas, nítidas gemas adventícias apareceram, únicas ou em grupos, com broto apical bem desenvolvido e acículas primárias, que após alongamento, se constituíram em "plântulas".

Para as observações realizadas aos 100 dias de cultivo (Tabela 25), 228 explantes (42,38% do total) se apresentavam com rugosidade superficial e destes, os que contribuíram com maior percentagem de representantes com rugosidade na superfície morfológica eram os segmentos da extremidade cotiledonar com 75% (31,78% do total), seguidos pelos explantes com o nó cotiledonar, 16,67% (7,06% do total), segmento cotiledonar próximo ao nó com 5,26% e 2,23% do total. Tendo em vista, a crescente quantidade de explantes com superfície morfológica rugosa, considerando-se os dados dos levantamentos efetuados aos 7, 25 e 100 dias, recomenda-se que maiores sejam os períodos de observações, visto que, do total amostrado menos de 50% se encontravam com rugosidade superficial (Figuras 4, 5, 9, 10, 11, 12 e 13).

As concomitantes observações feitas quanto à origem materna dos explantes que apresentavam características organogênicas (gemas), observou-se primórdios de gema em explantes cotiledonários da progênie M 1 aos 100 dias de cultivo, sendo este segmento classificado como estágio G 0 (Tabela 6).

Na progênie M 2 a frequência de primórdios foi maior que em relação à M 1, detectando-se 3 primórdios (2 de padrão evolutivo G 0 e 1 de padrão evolutivo G 1) na segunda avaliação (25 dias). Na terceira avaliação, a progênie M 2 apresentou 5 primórdios constituídos 4 de explantes cotiledo-

nares e 1 hipocotilar. Tendo em vista que, a quantidade de primórdios de gema emergentes da superfície morfológica dos explantes foi crescente em relação aos períodos de observação, constatou-se que talvez, período maior ao aplicado, fosse adequado para a confirmação da continuidade do processo morfogênico.

Os explantes da progênie M 3 não produziram gemas, enquanto que os da M 4 desenvolveram 3 gemas e destas, 2 originaram-se 25 dias após o início da cultura, respectivamente do nó apical e do hipocótilo. A terceira, de origem cotiledonar foi detectada somente aos 100 dias de cultivo.

Os explantes oriundos da progênie M 5, foram mais susceptíveis aos eventos organogênicos. Os dados do levantamento efetuado aos 7 dias da cultura, não apresentaram nenhuma evidência da manifestação morfogênica.

Para o levantamento efetuado aos 25 dias da cultura, os dados apresentaram a existência de explantes cotiledonares com 13 primórdios de gemas, sendo 6 de padrão evolutivo G 0 e 7 de padrão G 1.

Os dados do levantamento efetuado aos 100 dias da cultura, revelaram a existência de explantes cotiledonares com 13 primórdios de gemas sendo 1 primórdio de estágio evolutivo G 0, 11 primórdios de estágio evolutivo G 1, e 1 primórdio G 2.

Este assincronismo na emergência dos primórdios de gemas, na superfície morfológica dos explantes, também foram constatados por THORPE & PATEL (1986).

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiram as seguintes conclusões:

1. Segmentos cotiledonares, hipocotilares e nó cotiledonar de plântulas recém-germinadas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, cultivados "in vitro" mostraram variabilidade na capacidade de indução e produção de calo entre os diferentes tipos e fontes de explantes;
2. Os calos obtidos surgiram das camadas celulares internas da epiderme e foram friáveis, verdes ou amarelo claro;
3. Houve variabilidade na capacidade para produção de massa fresca e massa seca produzida entre os diferentes tipos e fontes de explantes;
4. A capacidade para a produção de calo entre os diferentes tipos e fontes de explantes na ordem da apresentação foram: extremidades cotiledonares; segmentos hipocotilares, nó cotiledonar e, finalmente, o segmento cotiledonar próximo ao nó;

5. A cultura de calo por período superior a 25 dias, "sem transferência", mostrou tendências ao escurecimento, sem aparente dano à produção do calo;
6. Houve organogênese direta, produção de gemas em segmentos cotiledonares, hipocotilares e não cotiledonar, de plântulas recém-germinadas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* cultivadas "in vitro", mostrando variabilidade nessa capacidade entre os diferentes tipos e fontes de explantes, após a passagem para meio de cultivo sem reguladores de crescimento;
7. Os explantes que apresentaram capacidade à morfogênese, organogênese direta, na ordem seqüencial da apresentação foram: extremidades cotiledonares, segmentos hipocotilares, segmentos cotiledonares próximos ao nó e, finalmente, os exemplares do nó cotiledonar;
8. As gemas obtidas surgiram em grupos sobre a superfície morfológica dos diferentes tipos e fontes de explantes;
9. As condições ambientais e químicas das culturas, foram satisfatórias para permitir a sobrevivência dos explantes acima de 67,40% durante 100 dias de cultivo;

10. Houve variabilidade na aparência rugosa da superfície morfológica, entre os diferentes tipos de explantes e os que apresentaram maior capacidade à rugosidade na epiderme de diferenciação. Na ordem seqüencial da apresentação foram: segmentos da extremidade cotiledonar, nó cotiledonar, segmento cotiledonares próximo ao nó e segmentos hipocotilares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, J.; HORGAN, K.J.; THORPE, T.A. Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. Canadian Journal of Forest Research, Ottawa, 11(1): 112-7, 1981.

AITKEN, J.; CHRISTIE, J.; THORPE, T.A. Clonal propagation: Gymnosperms. In: Cell Culture and somatic cell genetics of plants. New York, Academic Press, 1984. v.1, cap. 11, p. 82-95.

AMERSON, et alii. Loblolly pine tissue culture: laboratory, greenhouse and field studies. In: HOLLANDER, A. Basic life sciences. New York, Plenum Press, 1985. p.271-87.

BANDEL, G. Desenvolvimento e diferenciação em plantas. Piracicaba, 1979. 159p.

BARRICHELO, L.E.G. A madeira de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* como matéria prima para produção de celulose. Circular Técnica. IPEF, Piracicaba, (87): 1-6, jan. 1980.

BONGA, J.M. & DURZAN, O.J. Tissue culture in forestry. The Hague. Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers, 1982.

- BONGA, J.M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (ed.). Tissue culture in forestry. The Hague, Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers, 1982. p.4-35.
- BONGA, J.M. Vegetative propagation in relation to juvenility maturity and rejuvenation. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (ed.). Tissue culture in forestry. The Hague, Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers, 1982. p.387-413.
- BORMAN, C.H. & JANSSON, E. Organogenesis in cultured *Pinus sylvestris* tissue. Z. Pflanzenphysikal, 96: 1-6, 1980.
- BOULAY, M. In vitro propagation of tree species. In: GREEN, G.E.; SOMMERS, D.A.; HACKEFF, W.P.; BIESBOER, D.D. Plant tissue and cell culture. New York, Alan R. Liss, 1987. p. 367-82. (Plant Biology, v.3).
- BRITO, J.O. & BARRICHELO, L.E.G. Carvão vegetal de madeira de desbaste de *Pinus*. Circular Técnica. IPEF, Piracicaba, (146): 1-13, jun. 1982.
- BROWN, C.L. & SOMMER, H.E. An atlas of gymnosperms cultured in vitro: 1924-1974. Macon, Georgia Forest Research Council, 1975. 271p.
- CASTRO, P.R.C. Reguladores vegetais ação e aplicações na agri-horticultura. In: BANDEL, G. Desenvolvimento e diferenciação de plantas. Piracicaba, 1985. 10p. (mimeo - grafado).
- CIANCIULLI, P.L. Os pinheiros da América Central e México. São Paulo, 1961. 65p.
- DALLIMORE, W. & JACKSON, A. A handbook of Coniferae and Ginkgoaceae. London, Edward Arnold Ltda, 1966. 729p.

- DAVID, A. Vitro propagation of gymnosperms. In: BONGA, J. M. & DURZAN, D.J. Tissue culture in forestry. The Hague, Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers, 1982. p.72-108.
- DIETRICH, S.M.C. Inibidores de crescimento. In: FERRI, M.G. Fisiologia vegetal 2. São Paulo, EDUSP, 1979. p.193-212.
- DIETRICH, S.M.C. Mecanismos de ação dos reguladores de crescimento. In: FERRI, M.G. Fisiologia vegetal 2. São Paulo, EDUSP, 1979. p.213-29.
- DODDS, J.H. & ROBERTS, L.W. Experiments in plant tissue culture. Cambridge, Cambridge University Press, 1982. 150p.
- DURZAN, A.J. Special problems: adults vs juvenile explants. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (ed.). Handbook of plant cell culture. New York, McMillan Publishing Co., 1984. p.471-503.
- FARJON, A. Pines. Leiden, E.J. Brill/Dr. Blackhuys, 1984. 220p.
- FELIPPE, G.M. Desenvolvimento. In: FERRI, M.G. Fisiologia vegetal 2. São Paulo, EDUSP, 1979. p.1-37.
- FOSTER, A.S. & GIFFORD JR., E.M. Comparative morphology of vascular plant. London, W.H. Freeman and Co., 1959.
- FRANCO, E.O. & SCHWARZ, J.O. Micropropagation of two tropical conifers *Pinus oocarpa* Shied and *Cupressus lusitanica* Miller. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.J.; HOLLAENDER, A. (ed.). Tissue culture in forestry and agriculture. New York, Phenum Press, 1985. p.195-214.

FRAMPTON JR., L.J. & ISIK, K. Comparison of field growth among loblolly pine seedlings and three plant types produced in vitro. TAPPI Journal, Atlanta, : 119-23, jul. 1987.

GAMBORG, O.L. Callus and cell culture. In: WETTER, L.R. & CONSTABEL, F. Culture methods. Ottawa, Saskatoon, 1982. p.1-9.

GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture. Basingstake, Eastern Press, 1984. 690p.

GREENWOOD, M.S.; HARLOW, A.C.; HODGSON, H.D. The role of auxin metabolism in root meristem regeneration by *Pinus lambertiana* embryo cuttings. Physiol. Plant., 32:198-202, 1974.

GROUT, B. & SHORT, K. Fundamentals of plant tissue culture. Standon, Neo Plants Ltd., 1979. 46p.

GUPTA, P.K.; NADGIR, A.L.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANNATHAN, V. Tissue culture of forest tree clonal multiplication of *Tectona grandis* teak by tissue culture. Plant Sci. Lett., 17: 259-68, 1980.

HALL, D.O. & RAO, K.K. Fotossíntese. São Paulo, EDUSP, 1980. 89p.

HARLOW, W.M. & HARRAR, E.S. Textbook of dendrology. 5. ed. New York, McGraw-Hill, 1969. 512p.

HARVEY, A.E.; GRASHAM, J.L.; WALDRON, O.C. The effects of growth regulating compounds on healthy and blister rust infected tissue cultures of *Pinus monticola*. Phytopathology, 61: 507-9, 1971.

JACOBSEN, H.J. Biochemical mechanisms of plant hormone acting. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (ed.). Handbook of plant cell culture. New York, McMillan Publishing Co., 1983. p.672-95.

KAGEYAMA, P.Y. Melhoramento genético de pinheiros tropicais no Brasil. Circular Técnica. IPEF, Piracicaba, (111): 1-17, ago. 1980.

KONAR, W.N. In vitro studies on *Pinus*.II. The growth and morphogenesis of cell cultures from *Pinus gerardiana*. Phytomorphology, 25: 55-9, 1975.

LAMB, A.F.A. *Pinus caribaea*. Oxford, Department of Forestry, 1973. lv.

MEHRA-PALTA, A.; SMELTZER, R.H.; MOTT, R.L. Hormonal control of induced organogenesis experiments with excised plant parts of loblolly pine. TAPPI, Atlanta, 61(1): 37-40, jun. 1978.

METIVIER, J.R. Citocininas. In: FERRI, M.G. Fisiologia vegetal 2. São Paulo, EDUSP, 1979. p.93-126.

METIVIER, J.R. Giberilinas. In: FERRI, M.G. Fisiologia vegetal 2. São Paulo, EDUSP, 1979. p.129-61.

- MIROV, N.T. The genus *Pinus*. New York, Ronald Press, 1967. 602p.
- MOTT, R.L. & AMERSON, H.V. Tissue culture plantlets produced from *Pinus monticola* embryogenic materials. Forestry Science, 27(2): 299-304, 1977.
- MOTT, R.L. & AMERSON, H.V. A tissue culture process for the clonal production of loblolly pine plantlets. Technical Bulletin, North Carolina, (271): 1-14, 1981.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-97, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Physiol., 25: 135-66, 1974.
- PENCHEL, R.M. & KIRBY, E.G. Organogenesis in cultures of juvenile explants of *Araucaria angustifolia* and *A. heterophylla*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 4, Minnesota, August, 1986. Proceedings. p.309.
- REILLY, K. & BROWN, C.L. "in vitro" studies of bud and shoot formation in *Pinus radiata* and *Pseudotsuga menziesii*. Ga. For. Res. Paj., 86: 1-9, 1976.
- SANTOS, P.E.T. dos; MARTINI, S.L.; SANTOS, M.M.F.B. dos. Centro de Conservação Genética e Melhoramento de Pinheiros Tropicais. Circular Técnica. IPEF, Piracicaba, (161): 1-5, ago., 1988.
- SHARP, W.R.; LARSEN, P.O.; PADDOCK, E.F.; RAGHAVAN, V. Plant cell and tissue culture. Columbus, Ohio State University Press, 1979. 892p.

- SILVA, A.A. da, et alii. Programa de Pomares e Bancos Clo-
nais de *Pinus* spp. do Instituto Florestal do Estado de São
Paulo. Silvicultura, São Paulo, (28): 485-93, jan/fev.,
1983.
- SMITH, D.R. Radiata pine (*Pinus radiata* D. Don). In: BAJAJ,
Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry. I. Trees.
Berlin, Springer-Verlag, 1986. v.1, p.275-90.
- SOMMER, H.E. & BROWN, C.L. Application of tissue culture to
forest tree improvement. In: SHARP, W.R.; LARSEN, P. O.;
PADDOCK, E.F.; RAGHAVAN, V. (ed.). Plant cell and tissue
culture: Principles and applications. Columbus, Ohio Sta-
te University Press, 1979. p.451-91.
- STEIBERT, M.; WETHERBEE, P.J.; JOB, D.D. The effects of light
intensity and spectral quality on growth and shoot initia-
tion in tobacco callus. Plant Physiol., 56: 130-9, 1985.
- STREET, H.E. & WHITHERS, L.A. The anatomy of embryogenesis in
culture. In: STREET, H.E. (ed.). Tissue culture and plant
science. London Academic Press, 1974. p.71-100.
- THORPE, J.A. & BIONDI, A. Coniferous. In: EVANS, D.A.; SHARP,
W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (ed.). Handbook of plant
cell culture. New York, McMillan Publishing Co., 1984.
v.1, p.435-505.
- THORPE, J.A. & PATEL, K.R. Comparative morpho-histological
studies on the sites of shoot interaction in various co-
nifer explants. New Zealand Journal of Forestry Science,
Rotorua, 16(3): 257-68, 1986.

VALIO, I.F.M. Auxinas. In: FERRI, M.G. Fisiologia vegetal
2. São Paulo, EDUSP, 1979. p.39-72.

VIDAL, J.J. El pino: algunas especies de interes economico.
México, UTEHA, 1962. 233p.

WILLIAN, R.L. A guide to forest seed handling. Rome, FAO/
DANIDA, 1985. (Forestry Paper, 2012).

WINTON, L.L. & VERHAGEN, S.A. Shoots from douglas-fir cultu-
res. Canadian Journal of Botany, 55: 1246-50, 1977.

WITHERS, L.A. Minimum requirements for receiving and main-
taining tissue culture propagating material. Rome, FAO/
FOOD and Agriculture Organization of the United Nations,
1985. 33p.

YEOMAN, N.M. Tissue callus cultures techniques. In: Plant
tissue and cell culture. London, Blackwell Scientific Pu-
blications, 1973. p.31-58.

ZAERR, J.B. & MAPES, M.O. Action of growth regulators. In:
BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (ed.). Tissue culture in fo-
restry. The Hague, Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers,
1982. p.231-55.

A P Ê N D I C E S

Figura 4. Segmento hipocotilar de estágio evolutivo E 0, em detalhe da superfície morfológica de diferenciação (superfície lisa).

a)

b)

Figura 5. Vista da superfície morfológica de diferenciação;
a) vista geral; b) detalhe da superfície rugosa.

Figura 6. Calo da classe evolutiva 1 (início), em segmento hipocotilar de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, com 7 dias de cultivo.

Figura 7. Vista de um segmento cotiledonar de estágio evolutivo 2, para produção de calo, após 7 dias de cultivo.

Figura 8. Vista em detalhe de um calo de estágio evolutivo 3, de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, com 25 dias de cultivo.

Figura 9. Vista da superfície morfológica de diferenciação, de um explante de extremidade cotiledonar, com primórdios de gema de estágio evolutivo G 0 por organo gênese direta.

Figura 10. Superfície morfológica de diferenciação de um explante de extremidade cotiledonar, com primórdios de gema de estágio evolutivo G 0 (intermediário), por organogênese direta.

Figura 11. Superfície morfológica de diferenciação de um ex-
plante hipocotilar, com primórdios de gema de estã
dio evolutivo G 1, por organogênese indireta.

Figura 12. Em detalhe, vista lateral de uma gema de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, produzida por organogênese indireta.

Figura 13. Em detalhe, close da morfogênese de um primórdio de raiz de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* produzido por organogênese indireta (rizogênese).