EFEITO DE VÁRIAS FONTES DE NITROGÊNIO
NA MULTIPLICAÇÃO "in vitro" DE CLONES DE
Eucalyptus grandis HILL EX MAIDEN

MARIA THERESE GROTHGE

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área
de Concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1992

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

G873e Grothge, Maria Therese
Efeito de várias fontes de nitrogênio na multipli-
cação "in vitro" de clones de *Eucalyptus grandis* Hill
ex Maiden. Piracicaba. 1992.
86p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Clone de eucalipto - Propagação - Efeito do ni-
trogênio 2. Eucalipto - Clonagem 3. Eucalipto - Propa-
gação in vitro I. Escola Superior de Agricultura Luiz
de Queiroz. Piracicaba

CDD 634.9734

EFEITO DE VÁRIAS FONTES DE NITROGÊNIO
NA MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE CLONES DE
Eucalyptus grandis HILL EX MAIDEN

MARIA THERESE GROTHGE

Aprovada em: 16.09.1992

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo.....ESALQ/USP

Prof. Dr. Antonio Roque Dechen.....ESALQ/USP

Prof. Dr. Ricardo Rodrigues Ribeiro.....ESALQ/USP

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo
Orientador

Aos meus pais Hans e
Alice, e irmãos Hans
Joachim e Erika

Ao Oscar, pela presença
constante

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Dr. Otto Jesu Crocomo
- Dr. Quirino A. C. Carmello (Departamento de Química)
- Eng. Agr. Marina Murayama (Duratex Florestal)
- Prof. Luis Antonio Gallo (Departamento de Química)
- Técnicos, funcionários e estagiários do CEBTEC, em especial Vera Ap. Fávaro, Antonio F. de Campos Amaral, Maria Solizete Granziol Silva e Ênio Thiago de Oliveira.
- Funcionários da biblioteca central
- Aos colegas de Pós-Graduação
- CAPES
- DURATEX FLORESTAL

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Obtenção de Tecido Asséptico	4
2.2. Natureza do Meio de Cultura	5
2.3. Nitrogênio Inorgânico	8
2.4. Nitrogênio Orgânico	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Plantas Matrizes	15
3.2. Fonte e Preparo dos Explantes	15
3.3. Meio de Cultura Básico	16
3.4. Tratamentos Realizados	18
3.5. Avaliações dos Tratamentos	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Determinação de Proteína Solúvel	22
4.1.1. Tratamento 1 (testemunha)	22
4.1.1.a. Observações experimentais	24
4.1.2. Tratamento 2 (100 mg/l de URÉIA)	25
4.1.3. Tratamento 3 (200 mg/l de URÉIA)	26
4.1.4. Tratamento 4 (300 mg/l de URÉIA)	28
4.1.1.b. Observações experimentais	29
4.1.5. Tratamento 5 (800 mg/l de NH_4Cl)	34
4.1.6. Tratamento 6 (1000 mg/l de MH_4Cl) ...	36
4.1.7. Tratamento 7 (1200 mg/l de MH_4Cl) ...	37
4.1.1.c. Observações experimentais	39
4.1.8. Tratamento 8 (T_1 + 60 mg/l de GLU) ..	41
4.1.9. Tratamento 9 (T_1 + 30 mg/l de CYS) ..	43
4.1.10. Tratamento 10 (T_1 + 60 mg/l de GLU + 30 mg/l de CYS)	45

	Página
4.1.d. Observações experimentais	46
4.2. Massa de Matéria Fresca (g) e Massa de Matéria Seca (g)	49
4.2.1. 1ª Repicagem	49
4.2.1.1. Clone G0269	49
4.2.1.2. Clone G0694	50
4.2.1.3. Clone G0246	51
4.2.2. 2ª Repicagem	54
4.2.2.1. Clone G0269	54
4.2.2.2. Clone G0694	56
4.2.2.3. Clone G0246	57
4.2.3. 3ª Repicagem	59
4.2.3.1. Clone G0269	59
4.2.3.2. Clone G0694	60
4.2.3.3. Clone G0246	61
4.3. Determinação de Nitrogênio Total (%)	64
5. CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICE	79

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 1 (testemunha).	23
2	Comportamento dos três clones em relação ao teor protéico no tratamento 2.	26
3	Comportamento dos três clones em relação ao teor protéico no tratamento 3.	27
4	Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 4.	29
5	Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 5.	35
6	Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 6.	37
7	Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 7.	38
8	Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 8.	42
9	Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 9.	44
10	Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 10.	46

Figura		Página
11	Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 em relação à matéria fresca (g) nos 10 tratamentos na 1ª repicagem.	53
12	Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 em relação à matéria seca (g) nos 10 tratamentos na 1ª repicagem.	54
13	Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 em relação à matéria fresca (g) nos 10 tratamentos na 2ª repicagem.	58
14	Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 em relação à matéria seca (g) nos 10 tratamentos na 2ª repicagem.	59
15	Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 em relação à matéria fresca (g) nos 10 tratamentos na 3ª repicagem.	63
16	Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 em relação à matéria seca (g) nos 10 tratamentos na 2ª repicagem.	64
17	Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 nos 10 tratamentos, na 3ª repicagem. .	65

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Balanceamento dos tratamentos.	19
2	Concentração dos elementos (ppm).	19
3	Teor protéico dos três clones (tratamento 1).	23
4	Taxa de multiplicação nas 3 repicagens.	24
5	Teor Protéico dos três clones no tratamento 2.	25
6	Teor protéico dos três clones no tratamento 3.	27
7	Teor Protéico dos três clones no tratamento 4.	28
8	Grau de oxidação durante as 3 repicagens. ...	30
9	Formação de calos durante as 3 repicagens. .	31
10	Alongamento de gemas durante as 3 repicagens.	32
11	Coloração dos explantes nas 3 repicagens. ...	33
12	Teor Protéico dos três clones no (tratamento 5).	35
13	Teor protéico dos três clones no tratamento 6.	36

Tabela		Página
14	Teor Protéico dos três clones no tratamento 7.	38
15	Grau de necrose dos tecidos durante as 3 repicagens.	39
16	Teor Protéico dos três clones no tratamento 8.	42
17	Teor Protéico dos três clones no tratamento 9.	43
18	Teor Protéico dos três clones no tratamento 10.	45
19	Matéria fresca e matéria seca do clone G0269 nos 10 tratamentos na 1ª repicagem.	50
20	Matéria fresca e matéria seca do clone G0694 nos 10 tratamentos na 1ª repicagem.	51
21	Matéria fresca e matéria seca do clone G0246 nos 10 tratamentos na 1ª repicagem.	52
22	Matéria fresca e matéria seca do clone G0269 nos 10 tratamentos na 2ª repicagem.	55
23	Matéria fresca e matéria seca do clone G0694 nos 10 tratamentos na 2ª repicagem.	56
24	Matéria fresca e matéria seca do clone G0246 nos 10 tratamentos na 2ª repicagem.	57

Tabela		Página
25	Matéria fresca e matéria seca do clone G0269 nos 10 tratamentos na 3ª repicagem.	60
26	Matéria fresca e matéria seca do clone G0694 nos 10 tratamentos na 3ª repicagem.	61
27	Matéria fresca e matéria seca do clone G0246 nos 10 tratamentos na 3ª repicagem.	62
28	Teor de nitrogênio total (%) para os 3 clo- nes G0269, G0694 e G0246, nos 10 tratamentos na 3ª repicagem.	65

EFEITO DE VÁRIAS FONTES DE NITROGÊNIO
NA MULTIPLICAÇÃO "in vitro" DE CLONES DE
Eucalyptus grandis HILL EX MAIDEN

Autor: MARIA THERESE GROTHGE

Orientador: OTTO JESU CROCOMO

RESUMO

O objetivo do experimento foi estudar o efeito de várias fontes de nitrogênio na multiplicação e desenvolvimento dos clones de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden G0269, G0694 e G0246, os quais vinham sendo mantidos "in vitro" por cerca de 2 anos em meio contendo a proporção 3 : 1 de $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$, outros sais, vitaminas e adição de 0,2 mg/l de BA (Benziladenina).

Os tratamentos realizados constituíram uma alteração na fonte de nitrogênio e não na quantidade deste, com exceção dos tratamentos com aminoácidos, onde adicionou-se 60 mg/l Glu; 30 mg/l Cys; 60 mg/l Glu + 30 mg/l Cys ao meio MG_2 .

Como outras formas de nitrogênio utilizou-se separadamente uréia (100 mg/l; 200 mg/l e 300 mg/l) e cloreto de amônio (800 mg/l; 1000 mg/l e 1200 mg/l), havendo sempre um balanceamento das formas iônicas, mantendo-se o teor total de nitrogênio.

Os resultados mostraram que o meio MG_2 pode ser melhorado com a adição de uréia (em especial, 300 mg/l) onde ocorreu maior alongamento dos clones (principalmente G0694) e enraizamento para o clone G0269.

Os tratamentos com cloreto de amônio não tiveram um efeito positivo na multiplicação de gemas, enquanto

que a adição de aminoácidos provocaram uma melhoria nesta, especialmente para o clone G0269. Quando foi adicionada somente Cys ao meio MG_2 , os resultados foram negativos em relação a todos os parâmetros fisiológicos analisados.

EFFECT OF DIFFERENT SOURCES OF NITROGEN
IN THE "in vitro" MULTIPLICATION OF CLONES OF
Eucalyptus grandis HILL EX MAIDEN

Author: MARIA THERESE GROTHGE

Adviser: OTTO JESU CROCOMO

SUMMARY

The objective of this experiment was to study the influence of different sources of nitrogen in the multiplication and development of clones of *Eucalyptus grandis*, Hill ex Maiden G0269, G0694 and G0246 which were maintained "in vitro" for 2 years in medium containing 3 : 1 $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ ratio, other salts, vitamins and the addition of 0.2 mg/l of BA.

The treatments were an alteration in the source of nitrogen and not in its quantity, with the except of the treatments in which the following amino acids were added to MG_2 medium: Glu (60 mg/l); Cys (30 mg/l); Glu (60 mg/l) + Cys (30 mg/l) (no alteration in the salts was made).

Other forms of nitrogen were utilized such as: urea (100 mg/l, 200 mg/l and 300 mg/l) and ammonium chloride (800 mg/l; 1000 mg/l and 1200 mg/l), with adjustment in the total content of the nitrogen salts.

The results showed that the MG_2 medium can be improved with the addition of urea (specially 300 mg/l) in terms of shoot elongation (mainly in the clone G0694) and rooting of clone G0269.

The treatments with ammonium chloride did not show a positive effect in shoot multiplication, whereas the addition of amino acids promoted an improvement specially in

the clone G0269.

Addition of Cys as a sole source of amino nitrogen was negative relative to all physiological parameters analysed.

1. INTRODUÇÃO

A micropropagação de árvores oferece meios não somente para uma rápida multiplicação para produção de madeira como biomassa energética, mas também na preservação de espécies que se encontram ameaçadas de extinção.

Aproximadamente 15% do combustível mundial provém de biomassas, e a madeira é a fonte de energia mais utilizada. Espera-se que a demanda mundial por madeira irá duplicar até o final do século (BAJAJ, 1986).

O Brasil é o 8º produtor mundial de celulose e o 11º produtor de papel, alcançando em 1988, respectivamente, as marcas de 4,3 a 4,6 milhões de toneladas. Estima-se que até 1995 a contribuição das empresas florestais, associadas ao Instituto de Pesquisas Florestais (IPEF), representará um acréscimo de 2,6 milhões de toneladas, e será de 5,4 milhões de toneladas de celulose, de uma projeção total de 7,4 milhões de toneladas para o setor de produção de celulose. GARCIA (comunicação pessoal)¹

Devido ao fato de haver uma ampliação na demanda, principalmente em setores industriais, houve a implantação de um programa de desenvolvimento florestal visando a produção de árvores, melhoradas e de rotação reduzida.

A abordagem biotecnológica tem sido cada vez mais empregada pelas empresas florestais, juntamente com o

¹ GARCIA, C.H. (Instituto de Pesquisas Florestais, Piracicaba, SP) comunicação pessoal, 1991.

melhoramento florestal tradicional. Portanto, é um instrumento a mais na concentração de esforços para uma otimização da produção e qualidade da madeira produzida.

O gênero *Eucalyptus* sp constitui-se de numerosas espécies, abrangendo uma vasta distribuição geográfica e adaptadas às diversas condições climáticas. É natural da Austrália, Timor, Nova Guiné e Filipinas, crescendo em diversos climas e tipos de solos. Ao lado do seu valor comercial no uso da madeira, de fibras para fabricação de papel e óleos essenciais, emprega-se o eucalipto como quebra vento, além de ser usado para uma rápida cobertura dos solos, após a ação do fogo, visando prevenir a erosão.

A espécie *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden fornece alta qualidade de polpa em relação aos padrões de exportação das empresas florestais.

Para obter o crescimento de plantas "in vitro" é necessário a adição ao meio de cultura de compostos inorgânicos e de compostos orgânicos. A suplementação com vitaminas, sacarose e reguladores de crescimento também é importante.

Considerando a grande importância que as formas de nitrogênio têm no crescimento e diferenciação de células e tecidos cultivados "in vitro" realizou-se este trabalho. Os objetivos foram verificar os efeitos de fontes de nitrogênio (uréia, cloreto de amônio, glutamato e cisteína), em 3 clones de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden que estavam sendo mantidos em condições estáveis de cultura tanto químicas como ambientais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas décadas a biologia está podendo contar com uma ferramenta de pesquisa muito importante, a cultura de tecidos, a qual representa uma área de grande potencial na biologia de árvores.

O sucesso na manipulação de plantas ou nos processos de regeneração de órgãos geralmente está confinado àquelas plantas cujos cortes podem ser enraizados facilmente. Isto significa que a maioria das informações disponíveis sobre a propagação de plantas em cultura de tecidos tem sido obtida com plantas herbáceas (GONÇALVEZ, 1975).

De acordo com BONGA & DURZAN (1985), as principais razões para que a pesquisa com cultura de tecidos de plantas lenhosas esteja atrasada em relação a muitas culturas agrícolas são:

1. O longo ciclo de vida das árvores;
2. O uso de árvores adultas como fonte de explantes, ao invés de embriões e plântulas; sendo que os explantes têm que ser retirados de árvores desenvolvidas no campo;
3. Devido a problemas de cruzamento, as variações genéticas são, geralmente, maiores em árvores que em culturas agrícolas, resultando novamente em variabilidade e imprevisibilidade nos experimentos;
4. Tecidos de árvores são frequentemente morfogeneticamente insensíveis aos tratamentos experimentais atualmente utilizados. Como consequência disto, a obtenção de propagação vegetativa *in vitro* é, ainda, difícil

ou impossível para muitas espécies arbóreas;

5. Contaminantes microbianos endógenos estão frequentemente presentes, especialmente em tecidos de material crescido no campo. A remoção destes contaminantes é geralmente difícil e altas taxas de contaminação são comuns.

2.1. Obtenção de Tecido Asséptico

Um dos motivos para se ter um maior número de trabalhos realizados com plântulas ao invés material proveniente do campo decorre do fato de que, além da maior plasticidade dos tecidos juvenis, as plântulas podem crescer assepticamente e desta maneira eliminar problemas relacionados com a desinfestação de material proveniente do campo (BONGA & DURZAN, 1985).

Na superfície da planta encontra-se uma flora microbiana que, embora não prejudicial às plantas, multiplica-se rapidamente no meio de cultura modificando a sua composição. Segundo DE FOSSARD *et alii* (1977) a contaminação endógena representa um grave problema para todo material florestal coletado.

Em princípio, existem dois caminhos para se combater este problema. Uma maneira seria a cultura de meristemas, os quais estão isentos de microrganismos, devido à ausência de xilema e floema, nos mesmos. Porém, em *Eucalyptus sp* a utilização da cultura de meristemas é muito difícil devido ao seu tamanho reduzido e a presença de exsudatos fenólicos.

Uma outra alternativa segundo PIERIK (1987), seria a adição de antibióticos, o que pode conduzir a um fenômeno fitotóxico, pois são necessárias altas concentrações de antibióticos, o que pode inibir o crescimento e desenvolvimento no caso de plantas lenhosas, além de poder direcionar à uma seleção de microrganismos resistentes.

2.2. Natureza do Meio de Cultura

Em cultura de tecidos vegetais, os fatores a serem considerados podem ser agrupados em cinco amplas categorias (McCOWN e SELLMER, 1987):

- 1) genótipo, fonte e histórico;
- 2) composição do meio
- 3) ambiente (luz, temperatura, gases, frascos);
- 4) tempo (período de subcultivo);
- 5) interações entre os fatores acima.

O sucesso da propagação vegetal através da cultura de tecidos é bastante influenciado pela natureza do meio de cultura utilizado (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Presume-se que este meio deva conter todas as substâncias que os tecidos normalmente obtêm do floema e do xilema (BUTENKO, 1968). Portanto, um meio nutritivo consiste de componentes essenciais e também opcionais. Os nutrientes essenciais incluem sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e fitohormônios (reguladores de crescimento). Outros componentes, incluindo compostos nitrogenados orgânicos, ácidos orgânicos e substâncias complexas, podem ser importantes, mas são opcionais (GAMBORG e SHYLUK, 1981).

Composições nutricionais básicas foram adaptadas em relação aos tipos e concentrações, para espécies vegetais específicas e sistemas de cultura (calos, morfogênese) (GAMBORG, 1984).

Segundo o mesmo autor, os requerimentos nutritivos básicos de cultura de células, tecidos e órgãos são muito similares àqueles normalmente utilizados por plantas inteiras, ou seja, as células cultivadas "in vitro" podem responder às formas nitrogenadas pelas quais as células da planta inteira são expostas "in vivo". Isto parece ser particularmente verdadeiro para culturas de espécies vegetais de vida longa, incluindo espécies florestais (GAMBORG, 1984; DURZAN 1985).

Diversos sais suprem a necessidade de macro e micronutrientes. Sua adição ao meio de cultura é similar ao uso de fertilizantes, como fonte de nutrientes na manutenção de um crescimento saudável e vigoroso (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Muitas formulações de meio de cultura para plantas lenhosas aparecem na literatura. Não se sabe, porém, se todas essas diferenças nas formulações têm significado biológico. A maioria das espécies mostram diferenças qualitativas no crescimento, quando crescendo em distintas formulações de meios de cultura.

A base fisiológica para tais diferenças incluem especificidade genotípica e respostas isoladas, como deficiência em cálcio, sensibilidade ao cloro, inibição por alta concentração iônica (uma baixa concentração de sais raramente é inibidora ou letal ao desenvolvimento vegetal, embora possa não ser ótima), efeito do nível de nitrogênio total (McCOWN & SELLMER, 1987); este último estando relacionado com a concentração iônica.

Pode-se exemplificar tal fato referindo-se aos trabalhos de DRIVER & KUNIYUKI (1984) e de McCOWN & SELLMER (1987) onde o crescimento relativo à parte aérea aumentou quando ao meio foi adicionado nitrogênio.

Ao se analisar a composição de macronutrientes em diferentes meios nota-se grandes diferenças nas concentrações de vários sais e na concentração total iônica. Ambos os aspectos têm um efeito considerável sobre as taxas de crescimento e padrões morfogenéticos (BONGA, 1985).

Por exemplo, uma curta exposição dos tecidos a um meio rico em cálcio e nitrato, mas sem potássio, estimula o enraizamento em algumas culturas (Thipathi, 1971 citado por BONGA, 1985). Alto nível de potássio é requerido algumas vezes para a embriogênese (WETHERELL & DOUGALL, 1976) e um meio com alto nível de fosfato (Miller & Murashige (1976) citado por BONGA, 1985) ou baixo em nitrato de amônio (PIERIK, 1976) são ocasionalmente utilizados para in-

duzir formação de parte aérea. Em outras situações a concentração de cada elemento e as taxas entre vários elementos, embora importante, podem ser menos ineficientes do que a concentração de todos os sais combinados (McCOMB & BENNETT, 1986).

Nos últimos anos os requerimentos nutritivos de células e tecidos cultivados "in vitro" em plantas superiores têm atraído considerável atenção.

Meios de cultura definidos quimicamente e capazes de sustentar o crescimento e a divisão celular têm sido desenvolvidos (VELIKY e ROSE, 1973). O metabolismo do nitrogênio é uma característica muito importante da técnica da cultura "in vitro" especialmente quando usado para finalidade de desenvolvimento. É ele o componente que entra em maior proporção na constituição dos meios, e a qualidade e quantidade das fontes de nitrogênio influenciam fortemente o crescimento da cultura, além de poder influenciar também a bioquímica celular e a formação de metabólitos (VELIKY, 1972). Algumas das complexidades da nutrição nitrogenada para cultura de células e tecidos de plantas foram relatadas por GAMBORG *et alii* (1968); GAMBORG e SHYLUK (1970) e BAYLEY *et alii* (1972). Estes autores demonstraram que células de soja utilizaram o nitrogênio na forma de nitrato apenas na presença do íon amônio ou da glutamina. Por outro lado, tecidos de trigo cresceram em um meio onde o nitrato era a única fonte de nitrogênio.

HENSHAW *et alii* (1966) em condições onde o nitrogênio era o fator limitante observou um aumento no número de células quando se elevou o conteúdo de nitrogênio mas, paralelamente, isto também conduziu à uma diminuição na massa da matéria fresca e no tamanho celular.

A assimilação e o papel do nitrogênio no crescimento e desenvolvimento vegetal são pontos importantes para estabelecer um conhecimento da diferenciação celular. Ambas as formas (NO_3^- e NH_4^+) e a quantidade de nitrogênio no meio têm um efeito significativo na taxa de crescimento,

morfologia e totipotência celular. (WEISSMAN 1959,1964; THORPE, 1980; KIRBY *et alii* 1987). A acumulação de proteína em sementes "in vitro" é dependente da fonte de N (MOSQUIM & SODEK, 1991).

Tanto NO_3^- como NH_4^+ podem ser absorvidos e utilizados pelas plantas, e sob condições assépticas "in vitro" o nitrogênio reduzido é utilizado pelas culturas quando fornecido como amônio ou como nitrogênio combinado em certos compostos orgânicos (particularmente aminoácidos e uréia) contendo grupos amina ($-\text{NH}_2$) ou amida ($-\text{CONH}_2$).

A conversão enzimática de nitrato a amônio envolve o gasto de energia e, portanto, há uma vantagem ergonômica para tecidos vegetais cultivados receberem pelo menos parte do seu requerimento em nitrogênio na forma prontamente reduzida (GEORGE *et alii*, 1987). A maioria dos meios de cultura para tecidos vegetais, incluindo aqueles utilizados para cultura de células e tecidos de espécies florestais, incorporam tanto sais de nitrato como de amônio como fonte de nitrogênio para o crescimento (GAMBORG, 1970; STREET, 1973).

2.3. Nitrogênio Inorgânico

Segundo GAMBORG e SHYLUK (1981), os meios de cultura para espécies florestais, de uma maneira geral, incorporam tanto sais de nitrato como sais de amônio como fontes de nitrogênio para o crescimento e desenvolvimento.

KIRBY *et alii* (1987) afirmam que culturas de tecidos de coníferas e outras espécies arbóreas requerem uma combinação de íons amônio e nitrato para sustentar um crescimento satisfatório. A absorção de nitrogênio "in vitro" pode, portanto, depender de um balanço entre os íons amônio e nitrato (MARTIN & ROSE, 1976).

A multiplicação de células vegetais utilizando NH_4^+ como única fonte de nitrogênio foi relatado pela primeira vez por GAMBORG & SHYLUK (1970).

Vários trabalhos sugerem que insucessos na cultura de células vegetais em meio contendo amônio como única fonte de nitrogênio se deve a um excessivo decréscimo no pH em um meio fracamente tamponado (SHEAT *et alii*, 1959; MARTIN *et alii*, 1977; DOUGALL, 1980).

Um dos mais importantes constituintes do meio de cultura afetando a morfogênese é a fonte e a concentração de nitrogênio. Altos níveis de nitrogênio reduzido parecem ser benéficos para a organogênese da parte aérea (FLICK *et alii*, 1983). A embriogênese é um tipo de evento morfogenético reconhecidamente dependente da presença de nitrogênio reduzido (AMMIRATO & STEWARD, 1971; AMMIRATO, 1983, GEORGE *et alii*, 1987).

Entretanto, meios contendo amônio como única fonte de nitrogênio raramente são tão bem sucedidos como aqueles contendo tanto nitrato como amônio (WEISSMAN 1959; 1964; SARGENT & KING, 1974).

Segundo BEHREND & MATELES (1976) cultura de células vegetais usualmente não crescem utilizando amônio como única fonte de nitrogênio a menos que ácidos orgânicos sejam adicionados ao meio de crescimento.

Íons amônio podem causar toxicidade dentro de tecidos vegetais, a despeito dos efeitos benéficos dos amônio sobre muitos tipos de culturas vegetais (HAYNES & GOH, 1978).

Em plantas lenhosas, a alta concentração de íons no meio pode induzir a formação de vitrificação da parte aérea de algumas espécies, podendo inclusive, em casos mais drásticos, conduzir à morte da cultura (GASPAR *et alii* 1985; GEORGE *et alii* 1987; GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Para combater este efeito, as células rapidamente convertem o íon amônio em ácido L-glutâmico pela aminação do ácido α -cetoglutarico. A atividade da enzima responsável, desidrogenase do glutamato, é induzida por altas concentrações de amônio. Portanto, a presença de amônio no meio induz a um aumento na síntese de aminoácidos e proteí-

nas às expensas do metabolismo de carboidratos (GEORGE *et alii*, 1987). Suspensões celulares cultivadas em um meio definido, normalmente crescem em nitrato de amônio como fonte de nitrogênio (STRAUS, 1960; HALPARIN & WETHERELL, 1965; ERIKSSON 1965).

A concentração de nitrogênio e a proporção de amônio e nitrato podem ser críticas para o crescimento e morfogênese "in vitro" (HALPARIN & WETHERELL, 1965; REINERT *et alii*, 1967).

2.4. Nitrogênio Orgânico

A suplementação do meio de cultura com mistura de aminoácidos ou preparações comerciais de proteínas hidrolizadas frequentemente aumentam o crescimento de células (EARLE & TORREY, 1965; NICKELL e MARETZKI, 1969).

Para estimular o crescimento de células e tecidos vegetais em cultura é frequente o uso de nitrato suprido com várias formas de nitrogênio reduzido. (SHANTZ & STEWARD, 1959). Este representa uma fonte nitrogenada prontamente assimilável e energeticamente não dispendiosa, e pode ser de importância significativa para sustentar o crescimento de células em culturas nas ocasiões em que os mecanismos assimilatórios de nitrato e amônio não estão operando plenamente, e culturas de espécies florestais não constituem uma exceção ao caso (KIRBY *et alii*, 1987).

As formas específicas de nitrogênio orgânico as quais são prontamente assimiláveis pelas células vegetais e que possuem atividades promotoras de crescimento incluem aminoácidos, uréia, poliaminas e ureídeos.

A presença de sais de nitrato ou de amônio no meio não pode, em algumas ocasiões, substituir a necessidade de aminoácidos, os quais parecem ter um papel muito específico em diferentes estágios no processo de desenvolvimento.

Os aminoácidos podem servir como fonte de ni-

trogênio ou podem ser adicionados ao meio nutritivo contendo nitrato. O efeito destes aminoácidos difere para os vários tecidos ou para um tecido crescendo sob diferentes condições fisiológicas (WHITE, 1937).

Aminoácidos têm sido adicionados como fontes suplementares de nitrogênio para o meio de crescimento em cultura de células e tecidos vegetais em numerosos estudos (BEHREND & MATELES, 1976; GAMBORG & SHYLUK, 1981).

A adição de aminoácidos ao meio de cultura pode tanto estimular como inibir o crescimento de tecidos cultivados "in vitro" (BUTENKO, 1968; GAMBORG *et alii*, 1968; MARION-POLL & CABOCHE, 1984).

Embora a maioria das culturas com espécies florestais e herbáceas não requeiram aminoácidos suplementares a fim de crescer adequadamente "in vitro", em certos casos o crescimento e morfogênese podem ser incrementados.

Segundo GONÇALVES (1975) para muitos tecidos cultivados, aminoácidos isolados ou misturas destes são completamente inefetivos como única fonte de nitrogênio ou são nitidamente inferiores em relação ao nitrato. Por outro lado Demetriades (1958) citado por GONÇALVES (1975) encontrou para várias culturas de calos que ácido aspártico e algumas vezes ácido glutâmico ou arginina poderiam efetivamente substituir os requerimentos pelo nitrato.

RIKER e GUTSCHE (1948) observaram que ácido glutâmico, dentre outros aminoácidos agindo isoladamente, foi capaz de manter o crescimento normal de girassol embora fosse inferior à ação do nitrato. Da mesma maneira NITSCH & NITSH (1956) obtiveram um bom crescimento de cultura de calos de *Helianthus tuberosus* L. utilizando ácido glutâmico ou uréia juntamente com nitrato durante um período de 21 dias de crescimento.

Segundo KIRBY *et alii* (1987), o ácido glutâmico quando fornecido como única fonte de nitrogênio para cultura de células em suspensão de Douglas Fir que tinham crescido previamente em nitrato e amônia foi capaz de induzir

aumentos significativos nos níveis da redutase do nitrato embora o suprimento de nitrato no meio de controle tenha causado uma indução da enzima não conseguindo, contudo, manter o crescimento.

SANDSTEDT & SKOOG (1960) estudando os efeitos de aminoácidos componentes de extrato de levedura no crescimento de cultura de tecidos de tabaco encontraram que o ácido aspártico e ácido glutâmico promoveram o crescimento tal qual a mistura completa de aminoácidos. Estes dois aminoácidos, porém, poderiam ser omitidos sem causar danos na promoção do crescimento da cultura.

Os autores concluíram que eles tinham uma função múltipla servindo como uma fonte imediata para a biossíntese de outros aminoácidos.

WETHERELL & DOUGALL (1976) trabalhando com explantes de pecíolo de cenoura em cultura encontraram que ácido glutâmico e uréia poderiam individualmente e parcialmente, substituir cloreto de amônio como suplemento para o nitrato de potássio. O ácido glutâmico serviu não somente sustentando um bom crescimento, mas também, favorecendo embriogênese somática. Desta maneira, os autores constataram que uma fonte de nitrogênio reduzido é requerida no mínimo como suplemento em um meio que contenha nitrato, para um rápido crescimento e para a embriogênese somática em cenoura. Além do nitrato e amônio como fontes de nitrogênio para o crescimento, outras fontes isoladas também têm sido utilizadas. POLACCO (1976 e 1977) trabalhando com cultura de soja em suspensão verificou um crescimento desta quando forneceu-se uréia ao meio juntamente com a adição de níquel.

BEHREND & MATELES (1976) demonstraram que cultura de células pode usar uréia como uma fonte de nitrogênio.

A assimilação do nitrogênio proveniente da uréia é realizada através de duas vias metabólicas. A primeira envolve a hidrólise da uréia à amônio e dióxido de carbono por meio da ação da urease. Uma segunda via foi des-

crita em fungos, nos quais a uréia é convertida à alofanato através da ação da carboxilase da uréia. O alofanato é então hidrolizado à amônio e dióxido de carbono, através da ação da hidrolase do alofanato (KIRBY *et alii*, 1987). Segundo os autores, culturas que foram estabelecidas em meio contendo uréia como única fonte de nitrogênio cresceram mais lentamente que células mantidas em meio de cultura contendo nitrato e amônio. A utilização da uréia por plantas intactas e por culturas "in vitro" parece estar dependente da indução da urease.

KING (1977) observou que cultura de células de "sycamore" utilizaram preferencialmente nitrato à uréia quando ambas as formas de nitrogênio estavam presentes no meio.

De acordo com KIRBY *et alii* (1987) somente alguns trabalhos têm indicado que a uréia pode beneficiar a cultura de tecidos de espécies florestais. Segundo este autor, a literatura atual sugere que a uréia, apesar de ser um importante fertilizante em aplicações florestais, é pouco promissora como um fator de aumento do crescimento e desenvolvimento em cultura de células e tecidos em espécies florestais.

WHITE (1937) foi o primeiro a estudar o efeito do grupo SH da cisteína no crescimento de tecidos.

NORTON & BOLL (1954) também adicionaram cisteína ao meio de cultura.

Normalmente a cisteína, que é oxidada à cistina ou ácido cistéico, é adicionada ao meio de cultura para prevenir o escurecimento de explantes causado pela liberação de compostos fenólicos, o qual constitui um sério problema em explantes de *Eucalyptus sp* (GEORGE *et alii*, 1987).

O escurecimento de explantes, calos e meios em cultura de tecidos de *Eucalyptus sp* já foi muito relatado por vários autores (CRESSWELL & NITSCH, 1975; De FOSSARD, 1974; DURAND-CRESSWELL & NITSCH, 1977; GONÇALVES *et alii*, 1979).

De FOSSARD *et alii* (1977), trabalhando com *Eucalyptus sp.*, adicionaram cisteína ao meio de cultura a fim de evitar tal problema. Sharp *et alii* (1973) citado por GEORGE *et alii* (1987) adicionou 10mg/l de cisteína ao meio para controlar a oxidação de compostos fenólicos em cultura de *Coffea sp.*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Plantas Matrizes

Neste trabalho foram utilizados clones de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden do Projeto de Clonagem de Essências Florestais do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC)/ Departamento de Ciências Florestais (DCF)/ Dura-tex florestal.

Os clones G0269, G0694 e G0246 foram selecionados para o experimento.

3.2. Fonte e Preparo dos Explantes

Ramos dos clones foram coletados e então enviados para o laboratório do CEBTEC onde foram lavados em água corrente e desfolhados com o auxílio de uma tesoura de poda.

Os explantes (segmentos nodais com aproximadamente 1,0 a 1,5 cm de comprimento) foram posteriormente imersos em uma solução de Benlate (concentração de 300mg/l) autoclavada e Kasugamicina (antibiótico comercial - 4ml) e mantidos durante 4 horas em agitação.

Em câmara de fluxo laminar os explantes foram imersos em solução de hipoclorito de sódio (concentração final da solução: 1% de cloro ativo) acrescida de uma gota de Tween 20 e mantidos durante 20 minutos sob agitação. Após isto, foi realizada a lavagem do material (3 a 4 vezes) com água deionizada autoclavada durante 20 minutos seguido da

inoculação dos explantes em meio de cultura (meio básico de GONÇALVES (1980) modificado + 0,5mg BA + 0,5mg AIA).

Desta maneira foram estabelecidas as culturas estoque que posteriormente foram utilizadas como fonte de explantes na instalação do experimento. Estas culturas foram repicadas em intervalos de 21 a 25 dias sendo mantidas em condições ambientais constantes.

3.3. Meio de Cultura Básico

O meio de cultura básico utilizado foi o de GONÇALVES (1980) modificado e pelas substâncias que se seguem, em mg/l:

Thiamina -HCl	5,0
Ácido nicotínico -	0,5
Pantotenato de Cálcio -	1,0
Piridoxina -	0,5
Mio inositol -	100,0

Como fonte de carbono foi utilizada sacarose (30g/l). O meio de cultura básico foi acrescido de 0,2mg/l de BA. Para solidificação do meio usou-se agar marca Cialgas (6mg/l).

A seguir o meio de GONÇALVES (1980), modificado :

SAL	mg/l
1. NH_4NO_3	800
2. KNO_3	1000
3. KH_2PO_4	170
4. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236
5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
6. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Na_2EDTA	
7. H_3BO_3	6,2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,03
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,7
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,0
KI	0,75

A concentração das soluções estoque de macro e micronutrientes foi aumentada 50 vezes em relação à concentração destes nutrientes no meio de cultura básico e armazenadas em geladeira à 5 °C.

Nos tratamentos onde utilizou-se uréia como fonte de nitrogênio, o meio de cultura foi preparado e autoclavado pelo processo acima descrito, porém, sem a adição da solução de uréia.

Esta solução foi previamente esterelizada através de filtração em filtro de membrana Millipore e então adicionada no meio de cultura já autoclavado e ainda no estado líquido dentro da câmara asséptica.

3.4. Tratamentos Realizados

O objetivo do experimento foi o estudo do efeito de várias fontes de nitrogênio em um material que vinha sendo mantido sob as mesmas condições, tanto química (meio de cultura) quanto física (condições ambientais).

O tratamento denominado T_1 foi o meio de cultura no qual os clones já vinham sendo mantidos e multiplicados para a instalação do experimento (item 3.3).

Os tratamentos T_2 , T_3 e T_4 consistiram de adição de uréia nas concentrações de 100, 200 e 300mg respectivamente, sendo que a adição de uréia foi acompanhada pela redução de nitrato de amônio, mantendo-se constante o teor de nitrogênio total. O mesmo ocorreu com os tratamentos T_5 , T_6 e T_7 , entretanto, neste caso, foi adicionado cloreto de amônio (800, 1000 e 1200mg respectivamente).

Nos tratamentos T_8 , T_9 e T_{10} não houve alteração no meio GONÇALVES (1980) modificado, contudo houve a adição de ácido glutâmico (60mg/l) no tratamento T_8 ; cisteína (30mg/l) no tratamento T_9 e ácido glutâmico (60mg/l) juntamente com cisteína (30mg/l) no tratamento de T_{10} .

Os tratamentos 2, 3, 4, 5, 6 e 7 foram devidamente balanceadas mantendo-se o teor de nitrogênio total contido no meio GONÇALVES (1980) variando-se, portanto, a fonte de nitrogênio e não a quantidade deste.

As Tabelas 1 e 2 mostram o balanceamento realizado:

Tabela 1. Composição dos Tratamentos

Sais	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀
	(mg/l)									
NH ₄ NO ₃	800	534	267.4	-	-	-	-			
KNO ₃	1000	1000	1000	1000	1000	1000	984,5			
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170	170	170	170			
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236	236	236	236	236	236	-			
MgSO ₄	250	250	250	250	250	250	250			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8			
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3			
URÉIA	-	100	200	300	-	-	-			
NH ₄ Cl	-	-	-	-	800	1000	1200			
NaNO ₃	-	283	565,8	849	429,4	111,2	-			
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	-	-	-	-	-	147			
KCl	-	-	-	-	-	-	11,5			

Mg₂ + 60 mg/l GluMg₂ + 30 mg/l CysMg₂ + 60 mg/l Glu +
30 mg/l Cys

Tabela 2. Concentração dos Nutrientes (ppm).

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
URÉIA	-	46.6	93.2	140.0	-	-	-
NH ₄ ⁺	140.0	93.4	46.8	-	209.3	261.7	314.0
NO ₃ ⁻	306.6	306.6	306.6	306.6	237.3	184.9	132.6
N	446.6	446.6	446.6	446.6	446.6	446.6	446.6
P	38.7	38.7	38.7	38.7	38.7	38.7	38.7
K	435.4	435.4	435.4	435.4	435.4	435.4	435.4
Ca	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Mg	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7
S	36.7	36.7	36.7	36.7	36.7	36.7	36.7
Na	-	76.6	153.1	229.7	116.2	30.1	-
Cl							76.5

3.5. Avaliações dos Tratamentos

Os parâmetros analisados foram massa de matéria fresca e seca; determinação de proteína (Método de LOWRY) e determinação de nitrogênio total.

Para avaliar o efeito dos tratamentos nos clones, foram feitas medições para cada clone na introdução deste nos tratamentos (tempo zero).

Os clones foram analisados a cada 2 tratamentos, ou seja, no primeiro dia (tempo inicial) foram coletados os dados dos 3 clones para os tratamentos T_1 e T_2 . No segundo dia para T_3 e T_4 e assim sucessivamente. Portanto, cada clone foi avaliado novamente passados, exatamente 21 dias, como pode se observar pelo esquema 1:

ESQUEMA 1

Desta maneira, determinou-se o teor de proteína inicial, além do peso de matéria fresca e seca na instalação do experimento. Após 21 dias foram coletados 10 explantes, sendo cada um retirado de frascos diferentes escolhidos aleatoriamente. Destes explantes coletados, cinco foram utilizados na determinação da massa de matéria fresca e posteriormente da massa de matéria seca (o material permaneceu em estufa durante 5 dias a temperatura de 57 C). Dos outros 5 explantes foram preparadas 2 amostras para a determinação de proteína pelo método de LOWRY *et alii* (1951).

O material restante foi então repicado em câmara asséptica, retornando ao tamanho original (aproximadamente 0,5cm) sendo transferido para novo meio de cultura, obedecendo cada um ao seu tratamento. Foram realizadas 3 repicagens, em intervalos de 21 dias.

As determinações de proteína foram feitas utilizando-se apenas a parte aérea do aglomerado de gemas (explanete) enquanto que nas medições de massa de matéria fresca e seca foi utilizado todo o aglomerado de gemas (calo e parte aérea).

Para determinação de nitrogênio total utilizou-se o material proveniente da massa de matéria seca. Portanto, cada amostra corresponde a cinco explantes (somente parte aérea) de frascos diferentes. As análises foram feitas no Departamento de Química (ESALQ/USP).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação de Proteína Solúvel

A análise do teor protéico dos 3 clones estudados revela diferenças significativas entre clones em um mesmo tratamento e entre tratamentos com o mesmo clone.

O comportamento dos clones quanto ao teor protéico foi variável em função do meio de cultura utilizado, ou seja, em função da fonte e nível de nitrogênio.

4.1.1. Tratamento 1 (testemunha)

Dentro do tratamento T_1 , denominado testemunha, por ser o meio onde os clones se encontravam há várias repicagens, pode-se verificar diferenças durante as três repicagens que se seguiram (Tabela 3).

Os clones G0269 e G0246 não diferiram entre si embora o segundo tenha apresentado um teor protéico inferior ao primeiro, enquanto o clone G0694 mostrou-se superior em relação aos demais. Isto reflete as características clonais dos explantes, tendo cada um seus próprios requerimentos nutricionais, influenciando assim, o crescimento e as respostas quanto à nutrição em nitrogênio. O mesmo foi observado por CRAVEN *et alii* (1972) estudando o efeito do íon amônio no crescimento de explantes de cenoura.

Tabela 3. Teor protéico dos três clones (tratamento 1).

CLONE	TEOR PROTÉICO (mg/g)		
	R E P I C A G E N S		
	1ª	2ª	3ª
G0694	6.6 aA	6.4 aA	6.6 aA
G0269	3.9 bB	4.2 bB	4.7 bB
G0246	2.9 bB	3.7 bB	4.8 bB
C. V. %	9.1	7.8	8.8

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

A Figura 1, a seguir, mostra o teor protéico de cada clone no tratamento 1 durante as três repicagens consecutivas.

Figura 1. Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 1 (testemunha).

4.1.a. Observações experimentais

Além do teor protéico mais elevado, que o clone G0694 apresentou durante todas as repicagens, também foi observado um alongamento de gemas em relação aos clones G0269 e G0246, bem como uma maior formação de calos na base das folhas, constituindo uma característica do clone neste meio de cultura. Entretanto, este alongamento revela uma baixa taxa de multiplicação de gemas quando comparada com os outros clones (Tabela 4).

Tabela 4. Taxa de multiplicação nas 3 repicagens.

R E P I C A G E M									
1ª			2ª			3ª			
C L O N E									
	G0269	G0694	G0249	G0269	G0694	G0246	G0269	G0694	G0246
T ₁	3-4	2-3	4-5	3-4	2-3	4	3-4	2-3	4
T ₂	4-5	4-5	4	3-4	3	4	4	3	4
T ₃	3	3	4	(-)**	2	3	(-)**	3	4
T ₄	3	3	3	4	2	3	4	3	3
T ₅	2	1-2	2	2	1-2	2-3	2	1-2	2
T ₆	2	2	2	2	1-2	2-3	2	1-2	2
T ₇	2	2	2	3	2	3	3	2	3
T ₈	4-5	2	3	3	2	3-4	3	2	3
T ₉	2	2	2	2	(-)**	2	2	(-)**	3
T ₁₀	4-5	4-5	4-5	4	3	5	4	3	5

* Número de explantes obtidos de cada aglomerado de gemas formado no período de 21 dias após cada repicagem

** Perda por contaminação endógena

*** Perda por necrose total

O alongamento do clone G0694 foi acompanhado por uma coloração avermelhada, notada não apenas para este clone, mas para cada clone que apresentou alongamento, de acordo com o tratamento utilizado.

O clone G0269 apresentou enraizamento esporádico, não verificado para os outros clones.

4.1.2. Tratamento 2 (100 mg/l de URÉIA)

Apesar do clone G0694 apresentar em T_1 um conteúdo protéico superior, verificou-se um aumento após 21 dias da introdução, ou seja na análise do teor protéico da 1ª repicagem. O mesmo foi observado para o clone G0269 tendo este o mesmo comportamento do primeiro. Isto sugere que este tratamento seja melhor para o clone G0269. O clone G0246 não apresentou aumento no teor protéico em relação à T_1 como se pode observar na tabela que segue.

Tabela 5. Teor Protéico dos três clones no tratamento 2.

CLONE	TEOR PROTÉICO (mg/g)		
	R E P I C A G E N S		
	1ª	2ª	3ª
G0269	9.0 aA	7.3 aA	6.0 aA
G0694	8.8 aA	7.0 aA	5.3 aA
G0246	3.7 bB	3.8 bB	2.3 bB
C. V. %	9.1	7.8	8.8

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Na Figura 2, pode-se observar o efeito do tratamento nos três clones.

Figura 2. Comportamento dos três clones em relação ao teor protéico no tratamento 2.

4.1.3. Tratamento 3 (200mg/l de URÉIA)

O tratamento 3 também provocou um aumento inicial (1ª repicagem) no conteúdo protéico dos clones. O clone G0246 apresentou uma resposta favorável à adição de uréia ao meio de cultura, enquanto G0694 manteve-se semelhante ao tratamento 1 na 2ª repicagem, com uma leve diminuição na 3ª repicagem (Tabela 6). O clone G0269 apresentou contaminação endógena conduzindo à perda total do material, entretanto pode-se verificar um aumento no teor protéico na 1ª repicagem (Figura 3).

Tabela 6. Teor Protéico dos três clones no tratamento 3.

CLONE	TEOR PROTÉICO mg/g		
	R E P I C A G E N S		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a
G0269	7.7 aA	(-)*	(-)*
G0694	8.0 aA	6.0 aA	5.0 aA
G0246	5.8 bB	3.2 bB	3.7 bA
C. V. %	9.1	7.8	8.8

* Perda total por contaminação endógena.

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Figura 3. Comportamento dos três clones em relação ao teor protéico no tratamento 3.

4.1.4. Tratamento 4 (300 mg/l de URÉIA)

Neste tratamento novamente ocorreu um aumento para os três clones sendo maior na análise da 2ª repicagem para os clones G0269 e G0694. O efeito do tratamento 4 foi nitidamente favorável para o clone G0246 na 1ª repicagem em relação à T₁ (Tabela 7). O clone G0694 apresentou elevação substancial, e bem superior aos outros dois clones na 2ª repicagem. Apesar da diminuição no teor protéico para os três clones na 3ª repicagem, manteve-se a superioridade do clone G0694 (Figura 4).

Tabela 7. Teor Protéico dos três clones no tratamento 4.

CLONE	TEOR PROTÉICO (mg/g)		
	R E P I C A G E N S		
	1ª	2ª	3ª
G0269	6.4 bAB	6.8 bB	5.3 bB
G0694	5.9 bB	12.7 aA	8.2 aA
G0246	8.2 aA	5.1 cC	3.2 cC
C. V. %	9.1	7.8	8.8

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Figura 4. Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 4.

4.1.b. Observações experimentais

Durante as três repicagens nos tratamentos com uréia, os clones apresentaram boa taxa de multiplicação e desenvolvimento de gemas (Tabela 4), sendo melhor nos primeiros 15 dias após cada repicagem. Após este período evidenciava-se oxidação do meio de cultura (Tabela 8), principalmente para o tratamento 4. Também observou-se uma maior formação de calos na base das folhas (Tabela 9) no final de cada repicagem. Entretanto, deve-se ressaltar um maior enraizamento do clone G0269 no tratamento T₄ (ocorreu enraizamento em 18%, cerca de 11 explantes). Houve crescimento e desenvolvimento de raízes adventícias, além da raiz pivotante preenchendo completamente a parte inferior do frasco.

Como será visto adiante, apenas os tratamentos com uréia e glutamato (tratamento 10) apresentaram apreciável enraizamento.

Tabela 8. Grau de oxidação durante as 3 repicagens.

R E P I C A G E M									
1ª			2ª			3ª			
C L O N E									
	G0269	G0694	G0249	G0269	G0694	G0246	G0269	G0694	G0246
T ₁	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T ₂	+	+	+	++	++	++	++	++	++
T ₃	+	+	+	-	++	++	-	++	++
T ₄	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
T ₅	+	+	+	++	++	++	++	++	++
T ₆	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T ₇	+	+	+	++	+	+	+	+	+
T ₈	+	+	+	++	++	++	++	++	++
T ₉	+	+	+	+	-	+	+	-	+
T ₁₀	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ pouca oxidação;
 ++ média oxidação;
 +++ forte oxidação.

Tabela 9. Formação de calos durante as 3 repicagens.

R E P I C A G E M									
	1ª			2ª			3ª		
	C L O N E								
	G0269	G0694	G0249	G0269	G0694	G0246	G0269	G0694	G0246
T ₁	CB	CB/CF	CB	CB/CF	CB/CF	CB	CB/CF	CB/CF	CB
T ₂	CB	CB	CB	CB/CF	CB/CF	CB	CB/CF	CB/CF	CB
T ₃	CB	CB	CB	(-)*	CB/CF	CB/CF	(-)*	CB/CF	CB/CF
T ₄	CB	CB/CF	CB	CB/CF	CB/CF	CB	CB/CF	CB/CF	CB
T ₅	CB	CB	CB	CB/CF	CB/CF	CB	CB/CF	CB/CF	CB
T ₆	CB	CB	CB	CB/CF	CB/CF	CB/CF	CB/CF	CB/CF	CB/CF
T ₇	CB/CF	CF	CB/CF	CB/CF	CB/CF	CB/CF	CB/CF	CB/CF	CB/CF
T ₈	CB	CB	CB	CB	CB/CF	CB	CB	CB/CF	CB
T ₉	CB/CF	CB/CF	CB/CF	CB	(-)**	CB	CB	(-)**	CB
T ₁₀	CB	CB	CB	CB/CF	CB/CF	CB	CB/CF	CB/CF	CB

* Perda por contaminação endógena

** Perda por necrose total

CB Calos na base do explante

CF Calos na base da folha.

O clone G0694 não enraizou em nenhum dos tratamentos com uréia, enquanto G0246, em T₄, apresentou enraizamento na 2ª repicagem (apenas 2 explantes (3,3% enraizaram neste tratamento).

O tratamento 4, em relação ao padrão (T₁), provocou um maior alongamento de gemas como se pode verificar na Tabela 10.

Tabela 10. Alongamento de gemas durante as 3 repicagens.

R E P I C A G E M									
1ª				2ª			3ª		
C L O N E									
	G0269	G0694	G0249	G0269	G0694	G0246	G0269	G0694	G0246
T ₁	PO	PE	NH	PO	PE	NH	PO	PR	NH
T ₂	PO	PE	PO	PE	PO	PO	PE	PO	PO
T ₃	PO	PE	PO	(-)*	PE	PO	(-)*	PE	PO
T ₄	PE	MO	PO	PE	MO	ME	PE	MO	ME
T ₅	NH	PO	NH	ME	PO	ME	PO	PO	ME
T ₆	NH	PO	NH	NH	PO	ME	NH	PO	ME
T ₇	NH	PO	NH	NH	MO**	ME	PO	PO	MO
T ₈	NH	PO	NH	NH	PE	NH	NH	PE	NH
T ₉	PO	PE	PO	NH	(-)**	NH	NH	(-)**	NH
T ₁₀	NH	NH	NH	MO	MO	NH	MO	MO	PO

* Perda por contaminação endógena

** Folhas muito largas, alongamento não em altura mas em largura

*** Perda por necrose

PO: Tendência ao alongamento homogêneo (gemas com comprimento inferior a 1 cm de altura, difíceis de serem isoladas).

ME: Apresentam poucas gemas alongadas com comprimento pelo menos igual a 1cm (~ 1-2 gemas).

PE: Tendência ao alongamento. Somente com uma ou mais gemas alongadas que se sobressaem (comprimento superior a 1 cm).

MO: Maior tendência ao alongamento. Gemas alongadas com comprimento superior a 1 cm (mais de 3-4 gemas alongadas).

NH: Não há tendência ao alongamento.

Uma característica interessante que ocorreu nos tratamentos com uréia, está relacionada à coloração dos explantes. Após cada repicagem estes assumiram uma coloração verde intenso (Tabela 11), apresentando um aspecto vigoroso. Estudos envolvendo fontes de nitrogênio em embriões (ENGVILD, 1964), e em plântulas (CHARVEY, 1967) de *Pinus*, mostraram um aumento no teor de clorofila quando adiciona-

va-se uréia no meio de cultura. O mesmo foi observado por MINOCHA (1981).

Tabela 11. Coloração dos explantes nas 3 repicagens.

R E P I C A G E M									
	1ª			2ª			3ª		
	C L O N E								
	G0269	G0694	G0249	G0269	G0694	G0246	G0269	G0694	G0246
T ₁	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
T ₂	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
T ₃	VI	VI	VI	(-)*	VI	VI	(-)*	VI	VI
T ₄	VI	VI/AV	VI	VI	VI/AV	VI	VI	VI/AV	VI
T ₅	VE	VE	VE	VE	VE	VE	VE	VE	VE
T ₆	VE	VE	VE	VE	VE	VE	VN/VE	VN/VE	VN/VE
T ₇	VE	VE	VE	VE	VE	VE	VN/VE	VN/VE	VN/VE
T ₈	VN	VN	VN	VE	VN	VN	VE	VN	VN
T ₉	VE/AV	VE/AV	VE/AV	VE	(-)**	VN/VE	VE	(-)**	VN/VE
T ₁₀	VN	VN	VN	VE	VN/VE	VN	VE/AV	VN/VE	VN

* Perda por contaminação endógena

** Perda por necrose total

VE - verde escuro;

VN - verde normal;

VI - verde intenso;

AV - avermelhado.

Durante as três repicagens não se constatou a ocorrência de vitrificação dos tecidos.

A uréia representa um produto final na degradação de purinas (REINBROTH & MOTHES, 1962). Quando guanina é fornecida em plântulas de *Pinus* sp ela é prontamente convertida em uréia. (PANDITA & DURZAN, 1970). A assimilação do nitrogênio proveniente ocorre através da hidrólise da uréia para amônio e dióxido de carbono através da urease.

Segundo CROCOMO (1962), a uréia administrada a folhas de cafeeiro é hidrolisada nas células e proporciona N

e C para a síntese de aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos.

O carbamil forma-se da reação entre amônia, ATP e bicarbonato proveniente da hidrólise da uréia, se bem que o N amídico da glutamina pode ser uma fonte mais efetiva de amônia. A ornitina reage com o carbamil fosfato produzindo citrulina que condensa-se com ácido aspártico formando ácido argino succínico o qual é convertido para arginina, que além de ser constituinte de proteínas vegetais, acumula-se na planta como aminoácido solúvel podendo sofrer intensa metabolização e interconversões (CROCOMO, 1985). A clivagem da arginina produz uréia e regenera a ornitina (METZLER, 1977).

Portanto, a adição de uréia no meio de cultura mostrou-se benéfica para o crescimento e desenvolvimento dos explantes.

RIKER & GUTSCHE (1948) e SHANTZ & STEWARD (1959) também observaram o efeito favorável da adição de uréia ao meio de cultura.

4.1.5. Tratamento 5 (800 mg/l de NH_4Cl)

Na primeira repicagem houve uma nítida elevação do teor protéico para os clones G0269 e G0246, embora o último não difira significativamente do clone G0694. Entretanto houve um aumento substancial quando comparado com T_1 . Sendo o amônio uma fonte de nitrogênio prontamente assimilável pela planta (GEORGE *et alii*, 1987), a presença deste promove um aumento no conteúdo de aminoácidos e síntese protéica (KIRBY *et alii*, 1987).

Nas repicagens posteriores, ocorreu uma sensível diminuição para os três clones (Tabela 12). A queda no teor de proteína (Figura 5) pode ter ocorrido devido ao amônio ser considerado tóxico não podendo ser acumulado no citoplasma, ocasionando inibição enzimática, não acoplamento de elétrons (HAYNES & GOH, 1978) e oxidação de pirimidinas

(KIRBY *et alii*, 1987).

Tabela 12. Teor Protéico dos três clones (tratamento 5).

CLONE	TEOR PROTÉICO mg/g		
	R E P I C A G E N S		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a
G0269	10.1 aA	7.9 aA	3.7 aA
G0694	6.2 bB	4.3 bB	4.1 aA
G0246	6.2 bB	3.6 bB	4.6 aA
C. V. %	9.2	7.8	8.8

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Figura 5. Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 5.

4.1.6. Tratamento 6 (1000 mg/l de NH_4Cl)

Após 21 dias da introdução do material (1ª repicagem), não houve efeito para os clones G0269 e G0694 em relação à T_1 (Tabela 13). Entretanto o clone G0246 apresentou uma pequena elevação no teor protéico passando de 2.9 mg/g em T_1 para 4.6 mg/g em T_6 . Todavia, na 2ª repicagem observou-se um declínio para os clones G0694 e G0246, exceto para G0269, que apresentou uma elevação com posterior queda na última repicagem juntamente com os outros clones (Figura 6).

Tabela 13. Teor Protéico dos três clones no tratamento 6.

CLONE	TEOR PROTÉICO mg/g		
	R E P I C A G E N S		
	1ª	2ª	3ª
G0269	4.6 bA	7.9 aA	3.6 aA
G0694	6.3 aA	4.3 bB	3.6 aA
G0246	4.6 bA	3.2 cB	1.5 bB
C. V. %	9.2	7.8	8.8

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Figura 6. Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 6.

4.1.7. Tratamento 7 (1200 mg/l de NH_4Cl)

Houve uma elevação no teor protéico para os clones G0269 e G0246 na 1ª repicagem com diminuição nas repicagens posteriores (Tabela 14). Contudo, para o clone G0694 este tratamento, demonstrou, de imediato, um efeito negativo, com a diminuição no teor protéico, mantendo-se baixo durante as três repicagens (Figura 7).

Tabela 14. Teor Protéico dos três clones no tratamento 7.

CLONE	TEOR PROTÉICO (mg/g)		
	R E P I C A G E N S		
	1ª	2ª	3ª
G0269	5.4 aA	3.8 aA	3.9 aA
G0694	3.7 bA	3.8 aA	3.6 aA
G0246	4.1 abA	3.1 aA	3.2 aA
C. V. %	9.1	7.8	8.8

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Figura 7. Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 7.

4.1.c. Observações experimentais

Nos três tratamentos com NH_4Cl houve necrose dos tecidos para o tratamento 5 nas três repicagens, enquanto que para os outros clones em T_6 e T_7 praticamente não ocorreu (Tabela 15). Quanto à oxidação do meio de cultura, esta se mostrou insignificante durante as três repicagens nos tratamentos com NH_4Cl (Tabela 8). Os clones não apresentaram uma boa taxa de multiplicação de gemas (Tabela 4) também verificado por RIKER & GUTSCHE (1948) utilizando NH_4Cl . Ocorreu alongamento de gemas, entretanto o clone G0694 no tratamento 7 durante a 2ª repicagem apresentou folhas largas, indicando uma forte tendência ao alongamento.

Tabela 15. Grau de necrose dos tecidos durante as 3 repicagens.

R E P I C A G E M									
1ª			2ª			3ª			
C L O N E									
	G0269	G0694	G0249	G0269	G0694	G0246	G0269	G0694	G0246
T ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T ₃	+	+	+	(-)*	+	+	(-)*	+	+
T ₄	+	+	+	++	+	+	++	+	+
T ₅	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T ₆	++	++	++	+	+	+	+	+	+
T ₇	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T ₈	+	+	+	+++	+++	++	+++	+++	++
T ₉	+	++	+	++	(-)**	+++	++	(-)**	+++
T ₁₀	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Perda por contaminação endógena

** Perda por necrose total.

+ pouca necrose;

++ média necrose;

+++ forte necrose.

CRAVEN *et alii* (1972) estudando o efeito dos íons amônio no crescimento celular, verificou uma redução no tamanho celular devido à maior multiplicação, e eventualmente, maior alargamento celular. Em outras palavras, é lícito dizer que o amônio provocou um alongamento devido tanto à multiplicação como à expansão celular. O íon amônio altera a composição de solutos das células, afetando o conteúdo de solutos orgânicos e inorgânicos que as células normalmente armazenam, reduzindo seu potencial osmótico e, portanto, promovendo a entrada de águas nas células (CRAVEN *et alii*, 1972).

Nos tratamentos 6 e 7, observou-se que os três clones apresentaram um aspecto suculento, com uma coloração escura (Tabela 11) que os demais tratamentos indicando uma tendência à vitrificação, sem contudo apresentar o fenômeno tão relatado na literatura. JONES (1976) e WERNER & BOE (1980) atribuem as más formações referentes à vitrificação decorrentes da deficiência em clorofila e à um excesso de água na célula. Yoshida & Kohno (1982), citados por GEORGE & SHERRINGTON (1984), também observaram que altos níveis do íon amônio tendem a inibir a síntese de clorofila em cultura de calos.

Os três tratamentos apresentaram uma elevada incidência de calos formados na base das folhas, concordando com KIRBY & McCOWN (1987), e GEORGE & SHERRINGTON (1984), onde sugerem que o amônio induz a formação de calos.

O aumento na quantidade de amônio em relação ao nitrato poderia ser uma das causas para a baixa taxa de crescimento dos explantes. De acordo com SARGENT & KING (1974) o íon amônio inibiu o crescimento em cultura de células de *Haplopappus gracilis*. Segundo o mesmo autor, altas concentrações de amônio podem ter um efeito inibidor no ciclo dos ácidos tricarboxílicos e assim, limitar a formação de cetoácidos necessários para a síntese de aminoácidos e na transaminação. Uma evidência disto seria o aumento no crescimento de células em altas concentrações de

amônio suplementada com citrato, ocasionando um estímulo no ciclo dos ácidos tricarboxílicos e também provocando um aumento no nível dos nucleotídeos necessários para a síntese de ácido glutâmico. Recentes estudos indicam que succinato e malato também sofrem inibição em altas concentrações de amônio.

Segundo SALISBURY & ROSS (1985); EEWENS (1976); BOULD *et alii* (1983); MOHANTY & FLETCHER (1976); HAYNES & GOH (1978), a absorção de íons amônio provoca a liberação de íons H^+ e, conseqüentemente, a diminuição do pH, ocorre também a diminuição da absorção de íons NH_4^+ (que ocorre em pH próximo da alcalinidade). De uma maneira inversa, os íons NO_3^- são absorvidos em pH ácido.

Todavia, devido à diminuição de NO_3^- em razão do balanceamento dos tratamentos, este poderia não ser suficiente para sustentar um bom crescimento de gemas. Os autores WEISSMAN (1964); SHEN (1969); MINOTTI *et alii* (1969) verificaram que o íon amônio pode impedir a absorção de nitrato.

4.1.8. Tratamento 8 (T_1 + 60 mg/l de Glu)

Os tratamentos T_8 , T_9 e T_{10} correspondem à adição de aminoácidos isolados e em conjunto (Glu + Cys) ao tratamento 1.

Em T_8 , que corresponde à adição de ácido glutâmico à T_1 , verificou-se um forte aumento no teor protéico para os clones G0269 e G0694 na 1ª repicagem, ou seja, passados 21 dias da introdução dos explantes no meio de cultura, enquanto o clone G0246 não apresentou alteração (Tabela 16). Esta ocorreu na análise da 2ª repicagem, quando pôde-se perceber um sensível aumento neste clone, ao passo os clones G0269 e G0694 apresentaram uma diminuição no teor protéico mantendo-se, todavia, superior ao tratamento padrão (T_1) (Figura 8).

Na 3ª replicagem houve elevação do teor protéico apenas do clone G0269 (Figura 8).

Tabela 16. Teor Protéico dos três clones no tratamento 8.

CLONE	TEOR PROTÉICO (mg/g)		
	R E P I C A G E N S		
	1ª	2ª	3ª
G0269	11.5 aA	6.4 abAB	7.7 aA
G0694	9.9 bA	7.5 aA	6.4 bA
G0246	3.5 cB	5.5 bB	3.6 cB
C. V. %	9.1	7.8	8.8

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Figura 8. Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 8.

4.1.9. Tratamento 9 ($T_1 + 30$ mg/l de Cys)

Neste tratamento ocorreu um aumento no teor protéico para os três clones na 1ª repicagem (Tabela 17). Todavia, este aumento não se manteve nas demais repicagens, pois os clones sofreram um decréscimo no teor protéico na 2ª repicagem, culminando, inclusive, com a perda total do clone G0694 em função da necrose provocada pelo tratamento. O clone G0246 apresentou pouca variação na 3ª repicagem, enquanto G0269 aumentou bastante, sem contudo alcançar o patamar da 1ª repicagem (Figura 9).

Tabela 17. Teor Protéico dos três clones no tratamento 9.

CLONE	TEOR PROTÉICO (mg/g)		
	R E P I C A G E N S		
	1ª	2ª	3ª
G0269	9.8 aA	3.8 aA	7.1 aA
G0694	6.8 bB	(-)*	(-)*
G0246	6.3 bB	4.3 aA	3.1 bB
C. V. %	9.1	7.8	8.8

* Perda por necrose total dos tecidos.

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Figura 9. Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 9.

Apesar da cisteína ser adicionada em meios de cultura com a finalidade de reduzir a oxidação e necrose dos tecidos (Sharp *et alii* (1973); Staristky (1970); Sondahk *et alii* (1984); De Fossard *et alii* (1977) citados por GEORGE *et alii* (1987) e YEOMAN (1973), foi verificado um efeito inibidor do crescimento quando esta foi adicionada ao meio de cultura.

VERNON & STRAUS (1972) citado por GONÇALVES *et alii* (1979) verificaram que a cisteína não reduzia o efeito da enzima polifenoloxidase, dependendo do regulador vegetal adicionado ao meio de cultura. NORTON & BOLL (1954) também observaram uma inibição do crescimento e desenvolvimento de gemas com a adição de cisteína no meio de cultura.

4.1.10. Tratamento 10 (T_1 + 60 mg/l de Glu + 30 mg/l de Cys)

O efeito da adição de ácido glutâmico e cisteína ao tratamento 1 foi positivo para os três clones estudados (Tabela 18), principalmente para o clone G0269. A elevação do teor protéico para os clones G0694 e G0246 ocorreu na 2ª repicagem, e mantiveram os respectivos patamares na 3ª repicagem, enquanto que, o clone G0269 este aumento continuou a ocorrer de maneira linear (Figura 12).

Tabela 18. Teor Protéico dos três clones no tratamento 10.

CLONE	TEOR PROTÉICO (mg/g)		
	R E P I C A G E N S		
	1ª	2ª	3ª
G0269	5.3 aA	8.9 aA	12.0 aA
G0694	4.4 aA	8.8 aA	7.5 bB
G0246	2.6 bB	6.5 bB	5.7 cC
C. V. %	9.1	7.8	8.8

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Figura 10. Comportamento dos clones em relação ao teor protéico no tratamento 10.

4.1.d. Observações experimentais

O tratamento 9 apresentou forte necrose dos tecidos, culminando com a perda do clone G0694, evidenciando que a adição de aminoácidos também pode ter uma ação inibidora do crescimento e desenvolvimento, também verificado por MARION-POLL & CABOCHE (1984).

Os clones G0269 e G0246 apresentaram necrose moderada e forte respectivamente (Tabela 15). O tratamento 8 também apresentou necrose dos tecidos nas 2ª e 3ª repicagens. Entretanto, no tratamento 10 os clones sofreram pouca necrose durante as três repicagens.

Houve pouca oxidação do meio de cultura (Tabela 8) para os três tratamentos com aminoácidos. Os clones praticamente não apresentaram oxidação na 1ª repicagem.

Os tratamentos 8 e 9 apresentaram resposta menos favorável ao alongamento de gemas, ao passo que o tratamento 10 apresentou uma maior tendência ao alongamento em relação aos outros dois tratamentos. Verificou-se a formação de calos na base das folhas que apresentaram alongamento, além de coloração avermelhadas das gemas alongadas (Tabelas 9 e 11).

A formação de calos nos explantes (Tabela 9) foi menor para os tratamentos 8 e 9, apresentando a formação destes apenas na base do explante). No tratamento 10 verificou-se a formação de calos tanto na base das folhas como na base do explante.

A menor incidência de calos na base das folhas foi concomitante com a falta de alongamento dos clones nos tratamentos 8 e 9, observando-se uma relação entre alongamento e formação de calos. Neste caso, quanto mais alongado o material, maior a incidência de calos na base das folhas.

Nos tratamentos 8 e 10 a coloração dos explantes foi normal na análise da 1ª repicagem (Tabela 11). Na 2ª repicagem entretanto, o clone G0269 tornou-se verde escuro. No tratamento 9 observou-se o escurecimento dos clones, repetindo-se nas repicagens subsequentes.

Quanto à taxa de multiplicação houve um aumento para o clone G0269 no tratamento 8 na 1ª repicagem enquanto que nas repicagens posteriores houve diminuição desta (Tabela 4).

No tratamento 9 houve um decréscimo na taxa de multiplicação para os clones G0269 e G0246, enquanto G0694 teve perda total do material por necrose já citado anteriormente.

No tratamento 10 a taxa de multiplicação elevou-se para os clones G0269 e G0694 (Tabela 4) mantendo-se constante para G0246. Este aumento na taxa de multiplicação concorda com a literatura, onde o nitrogênio orgânico é utilizado para estimular o crescimento de células e tecidos

de plantas, sendo uma forma prontamente assimilada pela planta e, energeticamente, não dispendiosa (KIRBY *et alii*, 1987; GEORGE & SHERRINGTON, 1984; GEORGE *et alii* (1987).

Ao lado do aumento na taxa de multiplicação e teor protéico no tratamento 10, também foi verificado o enraizamento de explantes (clone G0269 nas 2ª e 3ª repicagem, em torno de 7 explantes no tratamento). Estas raízes cresceram e preencheram completamente a parte inferior do frasco. YOUNG (1973) verificou um considerável aumento no nível de enzimas da diversificação do nitrogênio proveniente do glutamato.

De acordo com WEBSTER (1959), aminoácidos podem contribuir para o estabelecimento de alto nível protéico na parte aérea devido à um efeito de ação de massa que inibe a quebra de proteínas ou, por atuar fornecendo precursores protéicos.

A glutamina é formada pela adição de um grupo NH_2 na carboxila mais afastada do ácido glutâmico. A enzima necessária é a glutamina sintetase. Pelo fato desta reação requerer ácido glutâmico como reagente, deve haver algum mecanismo para fornecê-lo, e isto é realizado pela reação catalisada pela glutamato sintase. Esta transfere o grupo amido da glutamina para o carbono do ácido α cetoglutarico formando 2 moléculas de ácido glutâmico. Um dos dois glutamatos é essencial para manter a reação inicial, mas o outro pode ser convertido diretamente em proteínas ou em outros aminoácidos necessários para a síntese de proteínas, clorofila, ácidos nucleicos, etc. Além disto, parte do glutamato é transportado para outros tecidos onde ele é usado do mesmo modo em processos de síntese.

Outra via de assimilação é feita através da glutamato desidrogenase que catalisa a reação entre NH_3 e α -cetoglutarato produzindo glutamato.

O glutamato transfere seu grupo amino diretamente para vários ácidos α ceto em reações reversíveis de transaminação. Um exemplo importante de transaminação ocorre entre glutamato e oxaloacetato produzindo α -cetoglutarato e aspartato.

O aspartato formado por transaminação pode transferir seu grupo amino para outros ácidos α -ceto para formar diferentes aminoácidos por reações de transaminação. A transferência para o piruvato, por exemplo, produz alanina. A alanina e outros aminoácidos podem então transferir seus grupos amino e assim numerosos aminoácidos são formados por transaminação (SALISBURY & ROSS, 1985).

4.2. Massa de Matéria Fresca (g) e Massa de Matéria Seca (g)

Para se estudar o efeito dos tratamentos na MF e MS determinou-se a quantidade destas no início do experimento (tempo 0). Não houve diferença ao nível de (1%) entre os clones no meio MG_2 (T_1) que corresponde ao meio de cultura no qual os explantes vinham sendo mantidos a várias repicagens.

4.2.1. 1ª Repicagem

4.2.1.1. Clone G0269

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para MF. De uma maneira geral a MS acompanhou a MF, como se pode ver pela Tabela 19:

Tabela 19. Matéria fresca e matéria seca do clone G0269 nos 10 tratamentos na 1ª repicagem.

TRATAMENTO	MF (g)	TRATAMENTO	MS (g)
T ₂	0.47 aA	T ₂	0.054 a A
T ₃	0.37 aA	T ₄	0.045 abAB
T ₆	0.36 aA	T ₃	0.041 abAB
T ₅	0.35 aA	T ₅	0.038 abAB
T ₁	0.34 aA	T ₈	0.036 bAB
T ₄	0.32 aA	T ₆	0.035 bAB
T ₁₀	0.31 aA	T ₁₀	0.033 b B
T ₈	0.30 aA	T ₉	0.032 b B
T ₉	0.27 aA	T ₁	0.032 b B
C.V. %	26.2		33.0

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade

Como se pode observar, o tratamento T₂ apresentou maior quantidade de MS. RIKER & GUTSHE (1948) também observaram um efeito positivo no crescimento quando adicionaram uréia ao meio de cultura. Comparando-se o efeito deste tratamento entre clones observa-se que houve um maior efeito deste sobre o clone G0269 (Figuras 11 e 12).

Os clones G0694 e G0246 não diferiram entre si ao nível de 5% em relação à MS (Tabela 31 - apêndice).

4.2.1.2. Clone G0694

Verificou-se que alguns tratamentos se destacaram dos demais tanto para MF como MS, como pode ser observado na Tabela 20:

Tabela 20. Matéria fresca e matéria seca do clone G0604 nos 10 tratamentos na 1ª repicagem.

TRATAMENTO	MF (g)	TRATAMENTO	MS (g)
T ₂	0.51 a A	T ₅	0.044 a A
T ₅	0.45 ab AB	T ₁₀	0.040 ab AB
T ₁₀	0.38 abcAB	T ₂	0.036 ab AB
T ₈	0.37 abcAB	T ₈	0.034 abcAB
T ₆	0.30 abcAB	T ₆	0.030 abcAB
T ₃	0.23 bc B	T ₄	0.028 abcAB
T ₄	0.21 c B	T ₉	0.026 bcAB
T ₉	0.20 c B	T ₇	0.019 c B
T ₁	0.20 c B	T ₉	0.018 c B
T ₇	0.19 c B	T ₁	0.018 c B
C. V. %	35.7		34.1

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade

Novamente pode-se verificar que o tratamento T₂ (100 mg/l de uréia) teve um bom efeito sobre este clone, assim como T₅ (800 mg/l de NH₄⁺), que corresponde à razão 1:3 NH₄⁺/NO₃⁻ (Figuras 11 e 12). Esta proporção de NH₄⁺ foi encontrado por FASOLO *et alii*, 1989; PREDIERI & MALAVASI, 1989; ABU-QAoud *et alii*, 1991).

4.2.1.3. Clone G0246

De uma maneira geral a MS acompanhou a MF em todos os tratamentos. O tratamento T₁₀ apresentou maior quantidade de MF e MS. Os menores valores para MF e MS foram encontrados nos tratamentos T₁ e T₇ (Tabela 21).

Tabela 21. Matéria fresca e matéria seca do clone G0246 nos 10 tratamentos na 1ª repicagem.

TRATAMENTO	MF (g)	TRATAMENTO	MS (g)
T ₁₀	0.63 a A	T ₁₀	0.048 a A
T ₉	0.44 ab AB	T ₄	0.045 ab A
T ₄	0.38 bcAB	T ₉	0.037 abc AB
T ₂	0.37 bcAB	T ₅	0.028 bcd BC
T ₆	0.34 bc B	T ₂	0.028 bcd BC
T ₈	0.31 bc B	T ₆	0.027 bcd BC
T ₅	0.31 bc B	T ₉	0.022 cd BC
T ₉	0.24 bc B	T ₈	0.022 cd BC
T ₁	0.19 c B	T ₇	0.020 cd BC
T ₇	0.18 c B	T ₁	0.017 d C
C. V. %	35.8		25.2

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade

No tratamento 10, no que tange à MF, o clone G0246 destacou-se sobremaneira em relação aos outros dois, sendo em média, 85% mais alto (1% de significância - Tabela 30 - apêndice).

Quanto à MS, o clone G0269 foi superior aos clones G0694 e G0246 nos tratamentos T₂ e T₉, sendo significativo ao nível de (1%) em relação aos outros dois clones no tratamento T₂ e apenas ao G0694 no tratamento T₉ (Figuras 11 e 12). O inverso ocorreu no tratamento T₁₀ onde o desempenho de G0246 foi acima dos outros sendo significativo à 1% para G0269 (Tabela 31 - apêndice).

* T₇ - Clone G0269 - Material insuficiente para análise

Figura 11. Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 em relação à matéria fresca (g), nos 10 tratamentos na 1ª repicagem.

Figura 12. Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 em relação à matéria seca (g) nos 10 tratamentos na 1ª repicagem.

4.2.2. 2ª Repicagem

4.2.2.1. Clone G0269

Na MF, o tratamento T_{10} , apresentou um valor mais elevado em relação aos demais tratamentos, não diferindo apenas de T_1 e T_8 a 1%. O tratamento T_{10} apresentou elevada quantidade de MS em relação aos demais, diferindo estatisticamente (1%) de T_5 , T_6 , T_7 e T_9 (Tabela 22).

Tabela 22. Matéria fresca e matéria seca do clone G0269 nos 10 tratamentos na 2ª repicagem.

TRATAMENTO*	MF (g)	TRATAMENTO	MS (g)
T ₁₀	0.64 a A	T ₁₀	0.056 a A
T ₁	0.46 ab AB	T ₂	0.041 ab AB
T ₈	0.40 bcABC	T ₄	0.040 ab AB
T ₄	0.36 bc BC	T ₁	0.039 abc AB
T ₂	0.36 bc BC	T ₈	0.034 bc AB
T ₆	0.32 bc BC	T ₆	0.026 bcd BC
T ₉	0.25 bc BC	T ₇	0.022 bcd BC
T ₇	0.24 bc BC	T ₅	0.020 cd BC
T ₅	0.20 c C	T ₉	0.010 d C
C.V.%	34.1		33.6

* No tratamento T₉ ocorreu perda por contaminação endógena. Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Pode-se observar que o tratamento T₉ mostrou uma maior absorção de água. Neste caso, também foi observada uma tendência à vitrificação do material, que não apresentou um bom crescimento. WARDLE *et alii* (1983) e ZIV *et alii* (1983) verificaram que um aumento no teor hídrico pode conduzir à vitrificação.

Na MF o clone G0269 foi superior ao G0694 (a 1%) no tratamento T₁ e ao G0246 (a 5%) em T₄ (Tabela 30 - apêndice). Na MS o mesmo foi verificado em T₁ (a 5%), não ocorrendo diferenças entre os demais tratamentos (Tabela 31 - apêndice).

4.2.2.2. Clone G0694

Neste clone ocorreu uma nítida diferença entre os tratamentos T_5 e T_{10} sendo o último três vezes superior ao primeiro. Os outros tratamentos foram intermediários, sem diferirem estatisticamente de T_5 e T_{10} (Tabela 23).

Tabela 23. Matéria fresca e matéria seca do clone G0694 nos 10 tratamentos na 2ª repicagem.

TRATAMENTO*	MF (g)	TRATAMENTO	MS (g)
T_{10}	0.46 a A	T_{10}	0.048 a A
T_8	0.37 ab AB	T_4	0.041 ab AB
T_7	0.33 ab AB	T_3	0.033 abc ABC
T_6	0.32 ab AB	T_8	0.033 abc ABC
T_3	0.29 ab AB	T_2	0.030 abc ABC
T_4	0.27 ab AB	T_7	0.026 bc ABC
T_1	0.25 ab AB	T_1	0.023 bc BC
T_2	0.24 ab AB	T_6	0.022 bc BC
T_5	0.16 b B	T_5	0.018 c C
C. V. %	34.1		33.6

* No tratamento T_9 ocorreu perda por necrose dos tecidos.
Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Basicamente a MS acompanhou a MF exetutando-se T_4 que, proporcionalmente, apresentou maior quantidade de MS. É fato que, neste tratamento houve um maior alongamento em relação aos demais tratamentos ficando com a haste espessa. O mesmo ocorreu com o teor protéico já discutido anteriormente.

Comparando-se os clones, quanto à MS, pode-se verificar que G0694 foi superior (a 1%) ao G0246, em T_4 (Tabela 31 - apêndice).

4.2.2.3. Clone G0246

O tratamento T_{10} apresentou maior quantidade de MF em relação aos demais tratamentos, embora não difira de T_6 (Tabela 24). O tratamento T_4 , ao contrário da 1ª repicagem, que demonstrou ser um bom tratamento, encontra-se entre os tratamentos mais fracos (Figura 13).

Tabela 24. Matéria fresca e matéria seca do clone G0246 nos 10 tratamentos na 2ª repicagem.

TRATAMENTO	MF (g)	TRATAMENTO	MS (g)
T_{10}	0.65 a A	T_{10}	0.043 a A
T_6	0.44 ab AB	T_2	0.040 ab AB
T_1	0.42 b ABC	T_1	0.031 abc ABC
T_7	0.38 bc BC	T_6	0.028 abc ABC
T_8	0.30 bc BC	T_7	0.024 abc ABC
T_2	0.28 bc BC	T_4	0.023 bc ABC
T_3	0.28 bc BC	T_3	0.022 bc ABC
T_9	0.25 bc BC	T_8	0.021 bc ABC
T_5	0.22 bc BC	T_9	0.020 bc BC
T_4	0.17 c C	T_5	0.016 c C
C. V. %	34.1		33.6

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

O tratamento T_{10} também apresentou alto conteúdo protéico.

Em relação aos outros clones houve diferença significativa (a 5%) entre os clones G0246 e G0694 na MF do tratamento T_{10} (Tabela 30 - apêndice).

* T₉ - clone G0269 - Perda por contaminação endógena
 T₉ - clone G0694 - Perda por necrose dos tecidos

Figura 13. Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 em relação à matéria fresca (g) nos 10 tratamentos na 2ª repicagem.

- * T₉ - clone G0269 - Perda por contaminação endógena
- T₉ - clone G0694 - Perda por necrose dos tecidos
- T₇ Material insuficiente para análise

Figura 14. Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 em relação à matéria seca (g) nos 10 tratamentos na 2ª repicagem.

4.2.3. 3ª Repicagem

4.2.3.1. Clone G0269

O tratamento T₉ apresentou maior valor para MF. Os de menor desempenho foram T₅ e T₇ (Tabela 25). RIKER & GUTSHE (1948) e GEORGE & SHERRINGTON (1984) também relataram em seus trabalhos uma inibição do crescimento com amônio. YOSHIDA & KOHNO (1982) verificaram uma inibição da síntese de clorofila com altos níveis de amônio. Neste

clone, em todos os tratamentos a MS acompanhou a MF (Figuras 15 e 16).

Tabela 25. Matéria fresca e matéria seca do clone G0269 nos 10 tratamentos na 3ª repicagem.

TRATAMENTO	MF (g)	TRATAMENTO	MS (g)
T ₈	0.53 a A	T ₈	0.056 a A
T ₁₀	0.46 abcd AB	T ₁	0.046 ab AB
T ₆	0.42 abcd AB	T ₂	0.042 abc AB
T ₁	0.38 abcd ABC	T ₇	0.041 bc ABC
T ₂	0.37 bcd ABC	T ₄	0.040 bc ABC
T ₉	0.32 bcd BC	T ₃	0.039 bcd ABC
T ₄	0.30 cd BCD	T ₉	0.030 cd BCD
T ₅	0.23 de CD	T ₉	0.024 de CD
T ₇	0.14 e D	T ₅	0.014 e D
C. V. %	27.4		25.7

* T₉ - Perda por contaminação endógena

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Quanto à MF o clone G0269 teve melhor desempenho sobre G0694 e G0246 (a 1%) nos tratamentos T₆ e T₈. Em T₂ foi superior apenas ao G0246 (a 5%). Nos tratamentos T₄, T₆ e T₈ a MS foi maior em relação aos demais, enquanto que em T₁ apenas sobre G0694 (Tabelas 30 e 31 - apêndice).

4.2.3.2. Clone G0694

Como no clone anterior a MS de todos os tratamentos foi proporcionalmente à MF (Tabela 26).

O tratamento T₁₀ apresentou maior valor nestes dois parâmetros apesar de não diferir estatisticamente de

outros tratamentos (Figuras 15 e 16).

É importante citar que comparando-o com o resultado do teor em proteína solúvel, este tratamento também mostrou uma boa performance. Isto concorda com a literatura, que cita aminoácidos como uma fonte suplementar de nitrogênio, utilizada no meio de cultura em numerosos estudos (BEHREND & MATELES 1975; GAMBORG 1970).

O tratamento T₅ apresentou menor desempenho na MF, MS e no teor em proteína solúvel.

Tabela 26. Matéria fresca e matéria seca do clone G0694 nos 10 tratamentos na 3ª repicagem.

TRATAMENTO*	MF (g)	TRATAMENTO	MS (g)
T ₁₀	0.39 a A	T ₁₀	0.036 a A
T ₉	0.29 abAB	T ₉	0.031 ab A
T ₁	0.24 abAB	T ₈	0.030 ab AB
T ₈	0.24 abAB	T ₂	0.027 abcAB
T ₇	0.23 abAB	T ₆	0.025 abcAB
T ₂	0.22 bAB	T ₄	0.023 abcAB
T ₆	0.21 bAB	T ₇	0.021 abcAB
T ₄	0.18 b B	T ₁	0.019 bcAB
T ₅	0.16 b B	T ₅	0.014 c B
C. V. %	27.4		25.7

* T₉ - Perda por necrose dos tecidos

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

4.2.3.3. Clone G0246

Novamente, o tratamento T₁₀ mostrou melhor comportamento em relação à MF; embora não tenha diferido estatisticamente de T₁, T₉, T₇ e T₈ (Tabela 27). Na MS, T₁₀

encontra-se entre os melhores tratamentos, juntamente com T_1 , apesar de diferir significativamente apenas de T_5 e T_9 a 5%. Como no clone G0694, o tratamento T_5 apresentou a menor quantidade de MF e MS. Os tratamentos T_1 e T_{10} também obtiveram os valores mais elevados de proteína solúvel.

Tabela 27. Matéria fresca e matéria seca do clone G0246 nos tratamentos na 3ª repicagem.

TRATAMENTO	MF (g)	TRATAMENTO	MS (g)
T_{10}	0.42 a A	T_1	0.040 a A
T_7	0.37 ab AB	T_{10}	0.034 ab AB
T_1	0.37 ab ABC	T_7	0.031 abcAB
T_8	0.27 abcABC	T_9	0.024 bcAB
T_9	0.26 abcABC	T_8	0.023 bcAB
T_2	0.24 bcAB	T_2	0.021 bc B
T_6	0.22 bc BC	T_4	0.021 bc B
T_9	0.21 bc BC	T_6	0.019 bc B
T_4	0.19 c BC	T_9	0.017 c B
T_5	0.18 c C	T_5	0.016 c B
C. V. %	27.4		25.7

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

Em relação ao tratamento T_7 a MF do clone G0246 foi superior aos clones G0269 e G0694 (a 1%). A MS, neste tratamento, também apresentou um bom resultado, tanto para G0246 como para G0694, sendo superiores ao G0269 (a 1%).

Os clones G0269 e G0246 foram superiores à G0694 (a 1%) no tratamento T_1 (Tabelas 30 e 31 - apêndice).

Este aumento em MF e MS no tratamento T_7 não significa, necessariamente, uma melhoria do tratamento em

relação à taxa de multiplicação dos clones, pois os explantes apresentaram a formação de calos na base das folhas, coloração escura, etc.

ROSE & MARTIN (1975b) e CRAVEN *et alii* (1972) verificaram que o íon amônio causou um aumento na MF e MS quando adicionado ao meio de cultura.

O tratamento T_{10} apresentou o maior valor na MF e segundo na MS, bem como no teor de proteína solúvel. Os explantes apresentaram ótima taxa de multiplicação, alongamento homogêneo, sem a ocorrência de calos nas folhas, evidenciando o efeito positivo da adição de aminoácidos ao meio de cultura.

* T_9 - clone G0269 - Perda por contaminação endógena

T_{10} - clone G0694 - Perda por necrose dos tecidos

Figura 15. Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 em relação à matéria fresca (g) nos 10 tratamentos na 3ª replicagem.

- * T₈ - clone G0269 - Perda por contaminação endógena
 T₉ - clone G0694 - Perda por necrose dos tecidos

Figura 16. Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246 em relação à matéria seca (g) nos 10 tratamentos na 3ª repicagem.

4.3. Determinação de Nitrogênio Total (%)

Devido à pequena quantidade de material disponível (20 mg) para a determinação do nitrogênio, e à metodologia de amostragem que foi possível empregar, ou seja, 5 explantes reunidos em uma única amostra, torna-se difícil tirar conclusões definitivas.

Os dados mostram que os tratamentos com níveis mais baixos de nitrogênio foram T₁ e T₄ para o clone G0269; T₄ e T₇ para o clone G0694 e T₄ para G0246. A grosso modo, poderia-se dizer que para todos os clones, o tratamento com

300 mg/l de uréia (T_4) foi o menos eficaz no que tange ao teor total de N no explante, como se pode verificar pela tabela e figura a seguir:

Tabela 28. Teor de nitrogênio total (%) para os 3 clones G0269, G0694 e G0246, nos 10 tratamentos na 3ª repicagem.

	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6	T_7	T_8	T_9	T_{10}
G0269	3.5	4.9	(-)*	4.0	5.0	5.2	5.8	4.8	5.4	5.6
G0694	5.5	5.0	4.8	3.2	5.2	4.6	4.1	4.7	(-)**	5.2
G0246	5.1	5.2	4.1	3.6	5.2	4.1	4.1	5.3	4.5	5.5

* Perda por contaminação endôgena

** Perda por necrose dos tecidos

Figura 17. Comportamento dos clones G0269, G0694 e G0246, nos 10 tratamentos, na 3ª repicagem.

5. CONCLUSÕES

Baseando-se nos dados obtidos nas condições experimentais deste trabalho, concluiu-se o seguinte:

1. O tratamento T_1 (testemunha), que representa o meio em que os clones vinham sendo mantidos, é um bom meio de multiplicação de gemas, podendo ser melhorado com a adição de fontes nitrogenadas orgânicas.

2. Os tratamentos com uréia, (Uréia 300 mg/l), provocaram alongamento dos 3 clones, sendo mais característico para o clone G0694. Também foi verificado um aumento no enraizamento para o clone G0269 (Uréia 300 mg/l).

3. Os tratamentos com NH_4Cl não provocaram efeito positivo na multiplicação de gemas nos 3 clones estudados, além de provocar alta incidência de calos formados na base das folhas, alteração na coloração e diminuição na taxa de multiplicação.

4. Os tratamentos com aminoácidos T_8 ($MG_2 + Glu$) e T_{10} ($MG_2 + Cys + Glu$) foram benéficos para o crescimento dos explantes dos 3 clones promovendo o alongamento do material.

5. A adição de cisteína em T_1 (testemunha) causou resposta negativa nos 3 clones. A intensidade da resposta foi variável de acordo com o clone.

6. O melhor tratamento, sem restrições, para o clone G0269 foi T_{10} (60 mg/l Glu + 30 mg/l Cys) que apresentou bom crescimento e alongamento de gemas.

7. Para o clone G0694, os tratamentos T_4 (Uréia 300 mg/l) e T_{10} (60 mg/l Glu + 30 mg/l Cys) apresentaram melhores resultados em relação ao teor proteico, enquanto que, para G0246 foram respectivamente T_{10} e T_1 (testemunha).

8. O tratamento com uréia (300 mg/l), nos primeiros 15 dias de cada repicagem, mostrou-se benéfico para o alongamento de gemas, enquanto T_{10} (60 mg/l Glu + 30 mg/l Cys) promoveu alongamento e multiplicação de gemas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-QAoud, H.; SKIRVIN, R.M.; BELLOW, F.E. Influence of nitrogen form and $\text{NH}_4^+-\text{N}/\text{NO}_3^--\text{N}$ ration on adventitious shoot formation from pear (*Pyrus communis*) leaf explants in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 27: 315-319, 1991.
- AMMIRATO, P.V. & STEWARD, F.C. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. *Bot Gaz.*, Chicago, 132(2): 149-158, 1971.
- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVAN, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y.; eds., *Handbook of Plant Cell Culture*. Vol I Techniques for Propagation and Breeding. Macmillan Publishing Company, New York. 1983. cap 2. p.82-123.
- BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology of tree improvement for rapid propagation and biomass energy Production. In: BAJAJ, Y.P.S., ed., *Biotechnology in Agriculture and Forestry I. Trees I* Berlin, Springer-Verlag, 1986. cap 1, p.1-7.
- BAYLEY, J.M.; KING, J.; GAMBORG, O.L. The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. *Planta (Berl.)*, 105: 15-24, 1972.
- BEHREND, J. & MATELES, F.I. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. II Role of organic acids during

- growth on ammonia. *Plant Physiology*, Lancaster, 58: 510-512, 1976.
- BONGA, J.M. & DURZAN, D.S. *Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. 1985. 450p.
- BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Dordrecht/Boston/Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. Vol I. 447p.
- BOULD, C.; HEWITT, E.J.; NEEDHAM, P. *Diagnosis of Mineral Disorders in Plants; principles*. London, ROBINSON, J.B.D., ed., 1983. vol. 1, 163p.
- BUTENKO, R.G. *Plant Tissue Culture and Plant Morphogenesis*. Ed. CHAILAKHYAMA, M.K., Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1968. 291p.
- CRAVEN, G.H.; MOTT, R.L. & STEWARD, F.C. Solute accumulation in plant cells. IV Effects of ammonium ions on growth and solute content. *Annals Botany*, Oxford, 36: 897-914. 1972.
- CRESSWELL, R. & NITSCH, C. Organ culture of *Eucalyptus grandis* L., *Planta* (Berl.), 125: 87-90, 1975.
- CROCOMO, O.J. Bioquímica de la respiración celular. Maracaibo, Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, 1962. 100p.
- CROCOMO, O.J. Assimilação de nitrogênio pelas plantas. In: FERRI, M.G., coord. *Fisiologia Vegetal*. 2ª ed. São Paulo, E.P.U., 1985. v. 1, cap. 4, p. 181-209.
- DE FOSSARD, R.A. Tissue culture of *Eucalyptus*. *Australian Forestry*, Melbourne, 37 : 43-54. 1974.

- DE FOSSARD, R.A.; BARKER, P.K.; BOURNE, R.A. The organ culture of four species of *Eucalyptus*. *Acta Horticulture*, The Hage, 78: 157-165, 1977.
- DOUGALL, D.K. Nutrition and Metabolism. In: STABA, E.J., ed. *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*, CRC Press, INC, Florida, 1980. p. 21-58.
- DRIVER, J.A. & KUNIYUKI, A.H. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *Hortscience*, Alexandria, 19(4): 507-509, 1984.
- DURAND-CRESSWELL, R. & NITSCH, C. Factor influencing the regeneration of *Eucalyptus grandis* by organ culture. *Acta Horticulture*, The Hage, 78: 149-155, 1977.
- EARLE, E.D. & TORREY, J.G. Morphogenesis in cell suspensions planted on synthetic media. *American Journal of Botany*, New York, 52(9): 891-899, 1965.
- EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultivated *in vitro*. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, 36: 23-28, 1976.
- ENGVILD, K.C. Growth and chlorophyll formation of dark-grown pine embryos on different media. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 17: 866-874, 1964.
- ERIKSSON, T. Studies on the growth requirements and growth measurement of cell culture of *Haploppapus gracilis*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 18: 976-993, 1965.
- FASOLO, F.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ*

Culture, Netherlands, 16 : 75-87, 1989.

FLICK, C.E.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Organogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., eds., *Handbook of Plant Cell Culture*. Vol I Techniques for propagation and Breeding. Publishing Company, New York, 1983. cap 1, p. 13-81.

GAMBORG, O.L. The effects of Amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiology*, Lancaster, 45: 372-375, 1970.

GAMBORG, O.L. Plant Cell Cultures: Nutrition and Media. In VASIL, I.K., ed., *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press, INC. Orlando, 1984. Vol I. p.19-25.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, New York, 50: 151-158, 1968.

GAMBORG, O.L. & SHYLUK, J.P. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. *Plant Physiology*, Lancaster, 45: 598-600, 1970.

GAMBORG, O.L. & SHYLUK, J.P. Nutrition media and characteristics of plant cell and tissue cultures. In THORPE, T.A., ed., *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press, New York. 1981. pp 21-44.

GASPAR, T.H.; PENEL, C.; CASTILLO, F.J.; GREPPIN, H. A two-step control of basic and acids peroxidases and its significance for growth and development. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 64: 418-423. 1985.

GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. *Plant Propagation by*

- Tissue Culture; Handbook and directory of commercial laboratories.* British Library, Great Britain, 1984. 709p.
- GEORGE, E.F.; PUTTOCK, D.J.M.; GEORGE, H.J. *Plant Culture Media. Vol. I Formulations and Uses.* British Library. 1987. 660p.
- GONÇALVES, A.N. *The growth and Developmental Physiology of Eucalyptus in Cell and Tissue Culture Systems,* Ohio State University. 1975. Master of Science. 210p.
- GONÇALVES, A.N. *Reversion to juvenility and cloning of Eucalyptus urophylla* S.T. Blake in cell and tissue culture systems. In: *Simpósio IUFRO em Melhoramento Genético e Produtividade de Espécies Florestais de Rápido Crescimento,* Águas de São Pedro, 1980.
- GONÇALVES, A.N. *Reversão e Juvenilidade e Clonagem de Eucalyptus urophylla* S.T. Blake "in vitro". Piracicaba ESALQ/USP, Piracicaba, 1982. Tese de doutoramento. 97p.
- GONÇALVES, A.N.; MACHADO, M.A.; CALDAS, L.S.; SHARP, W.R.; MELLO, H.D.A. *Tissue Culture of Eucalyptus.* In SHARP, W.R.; LARSEN, P.O.; PADDOCK, E.F., eds., *Plant Cell and Tissue Culture,* Ohio State Press, Columbus. 1979. p. 509-526.
- HALPARIN, W. & WETHERELL, D. *Ammonium requirement for embryogenesis in vitro.* *Nature,* London, 295: 519-520, 1965.
- HARVEY, A.E. *Tissue culture of Pinus monticola on a chemically defined medium.* *Canadian Journal of Botany,* Ottawa, 45: 1783-1787, 1967.
- HAYNES, R.J. & GOH, K.M. *Ammonium and nitrate nutrition of*

- plants. *Biol. Rev.*, Cambridge, 53: 465-510, 1978.
- HENSHAW, G.G.; JHA, K.K.; MEHTA, A.R.; SHAKESHAFT, D.J.; STREET, H.E. Studies on the growth in culture of plant cells, I Growth patterns in batch propagated suspension cultures. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 17: 362-377, 1966.
- JONES, O.P. Effect of phoridzin and phloroglucinol on apple shoots. *Nature*, London, 262: 392-393, 1976.
- KING, P.J. Studies on the growth in culture of plant cells. XXII. Growth limitation by nitrate and glucose in chemostat cultures of *Acer pseudoplatanus* L.. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 28(102): 142-155, 1977.
- KIRBY, E.G.; LEUSTEK, T. & LEE, M.S. Nitrogen Nutrition. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J., eds., *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Dordrecht/Boston/Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. Vol I, p. 67-88.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, Colchester, 193: 265-75, 1951.
- MARION-POLL, A. & CABOCHE, M. Relationship between auxin and amino acid metabolism of tobacco protoplast-derived cells. *Plant Physiology*, Lancaster, 75: 1048-1053, 1984.
- MARTIN, S.M. & DYSON, R. Growth of plant cell (*Ipomoea*) suspension cultures at controlled pH levels. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 54: 1264-1270, 1976.
- MARTIN, S.M.; ROSE, D.; HUI, V. Growth of plant cell sus-

pension cultures with ammonium as the sole source of nitrogen. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 55: 2838-2843, 1977.

MCCOMB, J.A. & BENNETT, I.J. *Eucalyps* (*Eucalyptus* spp). In BAJAJ, Y.P.S., ed., *Biotechnology in Agriculture and Forestry I. Trees I*. Berlin, Springer-Verlag, 1986. cap 7, p. 340-362.

MCCOWN, B.H. & SELLMER, J.C. General Media and Vessels Suitable for Wood Plant Culture. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J., eds. *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Dordrecht/Boston/Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. Vol I. p. 4-16.

METZLER, D.E. *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*. Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977. 1129p.

MINOCHA, S.C. Rolle of the source of nitrogen in the growth of shoot tips and callus cultures of woody plants in vitro. In IUFRO Sect S2015. Workshop in vitro. Cultivation Forest Tree Species, Fontainebleau, 1981. p. 227-235.

MINOTTI, P.L.; WILLIAMS, D.C. & JACKSON, W.A. The influence of ammonium on nitrate reduction in wheat seedlings. *Planta* (Berl.) 86: 267-271. 1969.

MOHANTY, B. & FLETCHER, J.S. Ammonium influence on the growth and nitrate reductase activity of Paul's Scarlet rose suspension cultures. *Plant Physiology*, Lancaster, 58: 152-155, 1976.

MOSQUIM, P.R. & SODEK, L. Culture of soybean fruit explants : growth conditions and efficiency of nitrogen sources

- for reserve protein syntethesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, 27: 71-76. 1991.
- NICKELL, L.G. & MARETZKI, A. Growth of suspension cultures of sugarcane cells in chemically defined media. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 22: 117-125, 1969.
- NITSCH, J.P. & NITSCH, C. Auxin - dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. I. *American Journal of Botany*, New York, 43: 839-851, 1956.
- NORTON, J.P. & BOLL, W.G. Callus and shoot formation from tomato roots in vitro. *Science*, Washington, 119: 220-221, 1954.
- PANDITA, M. & DURZAN, D.J. Metabolism of guanine by germinating jack pine seedlings. *Proc. Can. Soc. Plant Physiology*, Ottawa, 10: 62, 1970.
- PIERIK, R.L.M. *Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated in vitro. *Physiol. Plantarum*, Caopenhagen, 37: 80-82, 1976.
- PIERIK, R.L.M. *In Vitro Culture of Higher Plants*, Dordrecht, Martinus Hjhoff Publishers, 1987. 344p.
- POLACCO, J.C. Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. I assimilation of urea. *Plant Physiology*, Lancaster, 58: 350-357, 1976.
- POLACCO, J.C. Nitrogen metabolism in soybean tissue cultures. II Urea utilization and urease synthesis require Ni^{+2} . *Plant Physiology*, Lancaster, 59: 827-830, 1977.
- PREDIERI, S. & MALAVASI, F.F.F. High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M26 (*Malus*

- pumila* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 17: 133-142, 1989.
- REINBROTH, H. & MOTHES, K. Urea, ureides and guanidines in plants. *Annu. Rev. Plant Physiology*, Palo Alto, 13: 129-150, 1962.
- REINERT, J.; TAZAWA, M.; SEMENOFF, S. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis *in vitro*. *Nature*, London, 216: 1215-1216, 1967.
- RIKER, A.J. & GUTSCHE, A.E. The growth of sunflower tissue *in vitro* on synthetic media with various organic and inorganic sources of nitrogen. *American J. Botany*, New York, 35: 142-154, 1948.
- ROSE, D. & MARTIN, S.M. Growth of suspension cultures of plant cells (*Ipomoea* sp) at various temperatures. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 53: 315-320, 1975 a.
- ROSE, D. & MARTIN, S.M. Effect of ammonium on growth of plant cells (*Ipomoea* sp) in suspension cultures. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 53: 1942-1949, 1975 b.
- SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. *Plant Physiology*, 3rd ed., Wadworth Publishing Company, California. 1985, 540 p.
- SANDSTEDT, R. & SKOOG, F. Effects of amino acids components of yeast extract on the growth of tobacco tissue *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 13: 250-255, 1960.
- SARGENT, P.A. & KING, J. Investigations of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. *Canadian Journal Bot.*, Ottawa, 52:

1747-1755, 1974.

SHANTZ, E.M. & STEWARD, F.C. Investigations of growth and metabolism of plants. VII Sources of nitrogen for tissue culture under optimal conditions for their growth. *Annals of Botany*, Oxford, 23(91): 371-390, 1959.

SHEAT, D.E.G.; FLETCHER, B.H.; STREET, H.E. Studies on the growth of excised roots. VIII The growth of excised tomato roots supplied with various inorganic sources of nitrogen. *The New Phytologist*, Oxford, 58(2): 128-141, 1959.

SHEN, T.C. The induction of nitrate reductase and the preferential assimilation of ammonium in germinating rice seedlings. *Plant Physiology*, Lancaster, 44: 1650-1655, 1969.

STRAUSS, J. Maize endosperm tissue grown in in vitro. III Development of a synthetic medium. *American Journal of Botany*, New York, 47(8): 641-647, 1960.

STREET, H.E. *Plant Tissue and Cell Culture*. Blackwell Scientific Publications, Oxford/London/Edinburgh/Melbourne, 1973. 503p.

THORPE, T.A. Organogenesis In vitro: Structural, physiological and biochemical aspects. In VASIL, I.K., ed., *International Review of Cytology*. Supplement 11A, Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Academic Press, New York. 1980. p. 71-112.

VELIKY, I.A. Synthesis of carboline alkaloids by plant cell cultures. *Phytochemistry*, London, 11: 1405-1406, 1972.

VELIKY, I.A. & GENEST, K. Growth and metabolites of *Cannabis sativa* cell suspension cultures. *Lloydia*, Menasha,

35(4): 450-456, 1972.

VELIKY, I.A. & ROSE, D. Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 51: 1837-1844, 1973.

WARDLE, K.; DOBBS, E.B.; SHORT, K.C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, S. Joseph, 108: 386-389, 1983.

WEBSTER, G.C. Nitrogen metabolism in plants. Row-Peterson, Evanston, Illinois, 1959.

WERNER, E.M. & BOE, A.A. *In vitro* propagation of malling 7 apple rootstocks. *Hortscience*, Alexandria, 15(4): 509-510, 1980.

WEISSMAN, G.S. Influence of ammonium and nitrate on the protein and amino acids in shoots of wheat seedlings. *American Journal Bot.*, New York, 46(5): 339-346, 1959.

WEISSMAN, G.S. Effect of ammonium and nitrate nutrition on protein level and exudate composition. *Plant Physiology*, Lancaster, 39: 947-952, 1964.

WETHERELL, D.F. & DOUGALL, D.K. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plantarum*, Copenhagen, 37: 97-103, 1976.

WHITE, P.R. Vitamin B₁ in the nutrition of excised tomato roots. *Plant Physiology*, Lancaster, 12: 803-810, 1937.

YEOMAN, M.M. Tissue (callus) culture techniques. In: Street, H.E., eds. *Plant Tissue and Cell Culture*, Oxford, 1973.

- YOUNG, M. Studies on the growth in culture of plant cells.
XVI Nitrogen assimilation during nitrogen-limited growth
of *Acer pseudoplatanus* L. cells in chemostat culture.
Journal of Experimental Botany, Oxford, 24(83): 1172-85,
1973.
- ZIV, M.; MEIR, G.; HALEVY, A.H. Factors influencing the
production of hardened glaucous carnation plantlets in
vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* Dordrecht, 2:
55-65, 1983.

A P Ê N D I C E

Tabela 29. Comportamento dos clones durante as 3 repicagens nos 10 tratamentos testados em relação ao teor de proteína solúvel (mg/g).

R E P I C A G E N S				
	1ª (C.V.% = 1,1)	2ª (C.V.% = 7,8)	3ª (C.V.% = 8,8)	
	G0269 G0694 G0246	G0269 G0694 G0246	G0269 G0694 G0246	
T ₁	3.9f 6.6cd 2.9de	4.2d 6.4c 3.7cd	4.7de 6.6bc 4.7ab	
T ₂	9.8ab 8.7ab 3.7de	7.3bc 6.9c 3.8cd	6.0cd 5.4cde 2.9de	
T ₃	7.7cd 8.0abc 5.8bc	(-)* 6.0c 3.2d	(-)* 5.0def 3.8bcd	
T ₄	6.4de 5.9de 8.2a	6.8bc 12.7a 5.1abc	5.3de 8.2a 3.2cd	
T ₅	10.1ab 6.2cde 6.2b	7.9ab 4.3d 3.5d	3.8ef 4.1ef 4.6abc	
T ₆	4.5ef 6.3cde 4.6bcd	7.9ab 4.3d 3.2d	3.6ef 3.6f 1.5e	
T ₇	5.4ef 3.7f 4.1cde	3.8d 3.8d 3.1d	3.9f 3.6f 3.2cd	
T ₈	11.5a 9.9a 3.5de	6.4c 7.4bc 5.5ab	7.7b 6.4bcd 3.6bcd	
T ₉	9.8ab 6.8bcd 6.2ab	3.8d (-)** 4.4bcd	7.1bc (-)* 3.1cd	
T ₁₀	5.3ef 4.4ef 2.6e	8.9a 8.7b 6.5a	12.0a 7.5ab 5.7a	

Letras distintas, na vertical, diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

* Perda total devido à contaminação endógena

** Perda devido à necrose dos tecidos

Tabela 30. Massa de matéria fresca (g) dos clones nas 3 repicagens nos 10 tratamentos testados.

R E P I C A G E N S											
1ª (C. V. % 35.7)				2ª (C. V. % 34.1)				3ª (C. V. % 27.4)			
	G0269	G0694	G0246	G0269	G0694	G0246		G0269	G0694	G0246	
T ₁	0.34aA	0.20aA	0.19aA	0.46aA	0.25bB	0.43aAB		0.38aA	0.24bA	0.37aA	
T ₂	0.47aA	0.51aA	0.37aA	0.36aA	0.24aA	0.27aA		0.37aA	0.22bB	0.24bAB	
T ₃	0.37abA	0.23aA	0.44aA	(-)*	0.29aA	0.27aA		(-)*	0.29aA	0.26aA	
T ₄	0.32aA	0.21aA	0.38aA	0.36aA	0.27abA	0.17bA		0.30aA	0.18aA	0.19aA	
T ₅	0.35aA	0.45aA	0.31aA	0.20aA	0.16aA	0.23aA		0.23aA	0.16aA	0.18aA	
T ₆	0.36aA	0.29aA	0.34aA	0.32aA	0.32aA	0.44aA		0.42aA	0.21bB	0.22bB	
T ₇	(-)**	0.19aA	0.18aA	0.24aA	0.33aA	0.39aA		0.14bB	0.23bAB	0.37aA	
T ₈	0.30aA	0.37aA	0.31aA	0.40aA	0.37aA	0.30aA		0.53aA	0.24bB	0.26bB	
T ₉	0.27aA	0.20aA	0.24aA	0.25aA (-)**	0.25aA	0.25aA		0.32aA (-)**		0.21aA	
T ₁₀	0.31bB	0.38bB	0.63aA	0.64aA	0.46bA	0.65aA		0.46aA	0.39aA	0.42aA	

Letras distintas, na Horizontal, em cada repicagem diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

* Perda por contaminação endógena

** Perda por necrose total dos tecidos

*** Material insuficiente para análise

Tabela 31. Massa de matéria seca (g) dos clones nas 3 replicações nos 10 tratamentos testados.

R E P I C A G E N S				
	1 ^a (C. V. % 35.7)	2 ^a (C. V. % 34.1)	3 ^a (C. V. % 27.4)	
T ₁	G0269 G0694 G0246 . 017bA	G0269 G0694 G0246 . 039aA . 023bA . 031abA	G0269 G0694 G0246 . 046aA . 019bB	. 039aA
T ₂	. 032aA . 018bA	. 039aA . 023bA . 031abA	. 046aA . 019bB	. 021bB
T ₃	. 054aA . 036bB	. 041aA . 030aA . 040aA	. 042aA . 027bB	. 023aA
T ₄	. 042aA . 025bA	(-)* . 033aA . 022aA	(-)* . 031aA	. 021bB
T ₅	. 045aA . 028bB	. 040aAB . 042aA . 023bB	. 039aA . 023bB	. 016aA
T ₆	. 038abAB . 044aA	. 020aA . 018aA . 016aA	. 024aA . 014aA	. 019bB
T ₇	. 035aA . 030aA	. 026aA . 022aA . 028aA	. 040aA . 025bB	. 031aA
T ₈	(-)** . 019aA	. 022aA . 026aA . 024aA	. 015bB . 021abAB	. 023aA
T ₉	. 035aA . 034abA	. 034aA . 033aA . 021aA	. 056aA . 030bB	. 017bA
T ₁₀	. 032aA . 018bA	. 010aA (-)** . 020aA	. 030aA (-)**	. 034aA
	. 033bB . 039abAB . 048aA	. 056aA . 048aA . 043aA	. 041aA . 036aA	

Letras distintas, na horizontal, em cada replicagem diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (minúsculas) e 1% (maiúsculas) de probabilidade.

* perda total devido à contaminação endógena

*** perda devido à necrose dos tecidos

*** Material insuficiente para analizar

Figura 18. Comportamento dos 3 clones, em relação ao teor protéico, nos 10 tratamentos na 1ª repicagem.

Figura 19. Comportamento nos 3 clones, em relação ao teor protéico, nos 10 tratamentos na 2ª repicagem.

* clone G0269 em T₃ - Perda por contaminação endógena

** clone G0694 em T₉ - Perda por necrose dos tecidos

Figura 20. Comportamento dos 3 clones, em relação ao teor protéico, nos 10 tratamentos na 3ª repicagem.

* clone G0269 em T₃ - Perda por contaminação endôgena

** clone G0604 em T₉ - Perda por necrose dos tecidos