EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus taeda* L.

WAGNER APARECIDO VENDRAME
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO
NATAL GONÇALVES

Dissertação apresentada a Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz" da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
mestre em Ciências, Área de
Concentração : Fisiologia e
Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil
maio - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ

V453e Vendrame, Wagner Aparecido
Embriogênese somática em *Pinus taeda* L.
Piracicaba, 1994.
104p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia

1. Genética florestal 2. Pinheiro - Embriogênese
somática 3. Pinheiro - Melhoramento I Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 634.9751

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus taeda* L.

WAGNER APARECIDO VENDRAME

Aprovada em: 06.06.94

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antonio Augusto Lucchesi

ESALQ/USP

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

ESALQ/USP

Prof. Dr. Mário Ferreira

ESALQ/USP

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

Orientador

DEDICO

A Silvana, minha
namorada.

A minha mãe, Maria,
e aos meus avós
Rita e Aureliano.

AGRADECIMENTOS

- Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves, pela orientação no Brasil, apoio, estímulo e amizade.
- Prof. Dr. Harry Edward Sommer (EUA), pela recepção, orientação no exterior, supervisão do trabalho experimental e amizade .
- Dr. Paul Kormanik, do Laboratório de Ciências Florestais da USDA (EUA), pelos contatos realizados com a Comissão Florestal da Georgia.
- Dr. Johnny Branan, da Comissão Florestal da Georgia (EUA), pelo fornecimento de material e dados para o trabalho.
- Dr. João Lúcio de Azevedo, pelo apoio e amizade.
- Ao Dr. Walter Suiter e Engenheiro Paulo Eduardo Telles, do IPEF, pelo apoio.
- Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos, do Depto. de Ciências Florestais, ESALQ/USP, em particular ao Técnico Beto, pela orientação técnica.
- Aos amigos dos laboratórios da Universidade da Georgia (EUA): Prof. Dra. Hazel Wetzstein, Prof. Dr. Scott Merkle, Técnicos Beth Watson e Hazel Magner, pela assistência no trabalho.
- A todos os funcionários das bibliotecas da ESALQ, incluindo a central, do Depto. de Genética e do IPEF.

- Amigos da P.G., da Fisiologia e Bioquímica e das Ciências Florestais.
- Ao Setor de Pós-Graduação da ESALQ/USP, pelos serviços prestados.
- A Coordenação da P.G. da Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela oportunidade proporcionada.
- A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado no Brasil.
- Ao CNPq/RHAE, pela concessão da bolsa de especialização no exterior.
- A todos aqueles que, apesar de não citados, contribuíram de forma significativa à concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	<i>i</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	<i>vi</i>
RESUMO.....	<i>vii</i>
SUMMARY.....	<i>ix</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Descrição da espécie.....	5
2.1.1. Aspectos gerais.....	5
2.1.2. Habitat natural.....	6
2.1.3. Clima.....	6
2.1.4. Solo e topografia.....	7
2.1.5. Biologia.....	8
2.1.5.1. Reprodução e crescimento inicial.....	8
2.1.5.2. Produção e disseminação de sementes.....	10
2.1.5.3. Desenvolvimento do seedling.....	11
2.1.5.4. Reprodução vegetativa.....	12
2.1.5.5. Problemas fitossanitários.....	13

2.2. Métodos convencionais de propagação	
e melhoramento.....	14
2.2.1. Estaquia.....	15
2.2.2. Enxertia.....	16
2.2.3. Alporquia.....	17
2.3. Métodos não convencionais de propagação	
e melhoramento.....	18
2.3.1. Aspectos gerais.....	18
2.3.2. Cultura de tecidos.....	22
2.3.3. Embriogênese somática.....	24
2.4. Embriogênese somática em coníferas.....	25
2.4.1. Aspectos gerais.....	25
2.4.2. Aplicações.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1. Material vegetal.....	43
3.1.1. Seleção.....	44
3.1.2. Origem.....	45
3.1.3. Coletas.....	45
3.2. Procedimento laboratorial.....	47
3.2.1. Definição e preparo de meios de cultura.....	47
3.2.2. Preparo, esterilização e inoculação	
dos explantes.....	50
3.2.3. Condições ambientais de cultivo.....	57

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1. Contaminação.....	62
4.1.1. Efeito I - época de coleta.....	64
4.1.2. Efeito II - clone.....	64
4.1.3. Efeito III - meio de cultura.....	64
4.1.4. Interação I - clone X época de coleta.....	64
4.2. Crescimento e/ou desenvolvimento (indução).....	66
4.2.1. Efeito I - época de coleta.....	68
4.2.2. Efeito II - clone.....	68
4.2.3. Efeito III - meio de cultura.....	69
4.2.4. Interação I - clone X época de coleta.....	72
4.2.5. Interação II - clone X meio de cultura.....	73
4.2.6. Interação III - meio de cultura X época de coleta.....	74
4.2.7. Interação IV - clone X época de coleta X meio de cultura.....	75
5. CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
APÊNDICE.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência de 7 fases essenciais no estabelecimento de plantas derivadas de embriões somáticos.....	30
Figura 2. Sequência de requerimentos químicos e físicos para cada fase do processo de embriogênese somática.....	31
Figura 3. Esquema da disposição de embriões em placas de Petri no estabelecimento da cultura.....	54
Figura 4. Esquema de identificação das placas de Petri quando do estabelecimento das culturas.....	54
Figura 5. Número de placas planejado no desenho experimental para estabelecimento das culturas, para cada clone, para cada época de coleta.....	55

Figura 6. Número de embriões planejado no desenho experimental para estabelecimento das culturas, para cada clone, para cada época de coleta.....	55
Figura 7. Número de placas planejado no desenho experimental para estabelecimento das culturas, para cada meio, para cada época de coleta.....	56
Figura 8. Número de embriões planejado no desenho experimental para estabelecimento das culturas, para cada meio, para cada época de coleta.....	56
Figura 9. Número real de placas estabelecidas, para cada clone, para cada época de coleta.....	59
Figura 10. Número real de embriões inoculados, para cada clone, para cada época de coleta.....	59

Figura 11. Número real de placas estabelecidas, para cada meio, para cada época de coleta.....	60
Figura 12. Número real de embriões inoculados, para cada meio, para cada época de coleta.....	60
Figura 13. Número de placas contaminadas, para cada clone, para cada época de coleta.....	63
Figura 14. Percentagem de placas contaminadas, para cada clone, para cada época de coleta.....	63
Figura 15. Número de placas com indução de calos, para cada clone, para cada época de coleta.....	67
Figura 16. Percentagem de placas com indução de calos, para cada clone, para cada época de coleta.....	67

Figura 17. Número de placas com indução de calos, para cada meio, para cada época de coleta, para o clone 520.....	70
Figura 18. Número de placas com indução de calos, para cada meio, para cada época de coleta, para o clone 558.....	70
Figura 19. Número de placas com indução de calos, para cada meio, para cada época de coleta, para o clone 590.....	71
Figura 20. Número de placas com indução de calos, para cada meio, para cada época de coleta, para o clone 615.....	71
Figura 21. Número de placas com indução de calos, para cada meio, para cada época de coleta, para os 4 clones.....	72
Figura 22. Número total de placas com indução de calos, para cada clone, para cada meio.	73

Figura 23. Número de placas estabelecidas, para cada clone, para cada meio.....	74
---	----

Figura 24. Número de placas estabelecidas, para cada meio, para cada época de coleta...	75
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABA.....	ácido abscísico
BAP.....	benzil amino purina
°C.....	graus Celsius
cc.....	centímetros cúbicos
cm.....	centímetro
2,4-D.....	ácido 2,4 diclorofenoxiacético
E.U.A.....	Estados Unidos da América
g.....	grama
IBA.....	ácido indol butil acético
kg.....	kilograma
l.....	litro
m.....	metro
mg.....	miligrama
mm.....	milímetro
mM.....	micromolar
NAA.....	ácido naftaleno acético

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus taeda* L.

Autor: Wagner Aparecido Vendrame

Orientador: Antonio Natal Gonçalves

RESUMO

Com o objetivo de determinar um protocolo viável para a biotecnologia de embriogênese somática, analisando os fatores que afetam o processo e suas interações, e fornecer subsídios para sua utilização em processos de melhoramento florestal, foram estabelecidas culturas de embriões imaturos de 4 diferentes clones de *Pinus taeda* L., coletados em 7 diferentes épocas e utilizando-se 5 diferentes meios de cultura de tecidos, como meios de estabelecimento ou indução.

Das espécies de *Pinus* conhecidas e utilizadas no setor florestal, *Pinus taeda* é considerada a espécie florestal, sob o aspecto econômico, mais importante do sul dos E.U.A. e a segunda mais importante no mundo. No Brasil, foi introduzida com grande sucesso. Devido a sua excelente adaptação na região sul, principalmente nos Estados do Paraná e Santa Catarina, é utilizada em programas de reflorestamento.

O experimento foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos da Escola de Recursos Florestais "Daniel B. Warnell", da Universidade da Georgia, em Athens, Estado da Georgia, E.U.A., sob supervisão do prof. Dr. Harry E. Sommer e com a colaboração da Comissão Florestal da Georgia e do Serviço Florestal, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos.

Os resultados obtidos permitem concluir que o protocolo para indução de embriogênese somática desenvolvido mostrou-se viável, resultando na indução de calos com características embriogênicas. A frequência de indução de calos foi da ordem de 36,6%.

Foram também demonstrados efeitos de 3 fatores (clone, meio de cultura e época de coleta) e da interação entre eles sobre a percentagem de indução, indicando que genótipo, ambiente físico e estágio de desenvolvimento afetam a regeneração *in vitro*.

As técnicas de embriogênese somática podem resultar, se bem adequadas, manejadas e incrementadas, em taxas de indução maiores, sendo uma ferramenta auxiliar nos processos de melhoramento florestal.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Pinus taeda* L.

Author: Wagner Aparecido Vendrame

Advisor: Antonio Natal Gonçalves

SUMMARY

In order to determine a viable protocol for the biotechnology of somatic embryogenesis, analysing the factors which affect the process and their interactions, and provide subsidies for its use in processes of forest improvement, immature embryos cultures were established from 4 different clones of loblolly pine (*Pinus taeda* L.), collected in 7 different dates and using 5 different tissue culture media as establishment or induction media.

From all the pine species known and used in forestry, loblolly pine is considered, under economical aspects, the most important forest tree in the south of the United States and the second most important in the world. It was successfully introduced in Brazil due to its excellent adaptation in the south, in particular the States of Paraná and Santa Catarina, being used in reforestation programmes.

The experiment was carried out in the tissue culture laboratory, of the Daniel B. Warnell School of Forest Resources, of The University of Georgia, in Athens, State of Georgia, U.S.A., under supervision of prof. Dr. Harry E. Sommer, and with the collaboration of the Georgia Forestry Commission and the U.S.D.A. Forest Service.

The results obtained allow us to conclude that the protocol developed for the induction of somatic embryogenesis was viable, having as result the induction of calli with embryogenic characteristics. The frequency of induction was around 36.6%.

The techniques of somatic embryogenesis can result, if well adjusted, managed and improved, in higher induction rates, being a helpful tool for the process of tree improvement.

1. INTRODUÇÃO

As gimnospermas são divididas em 5 ordens: Coniferales (ou Coniferae), Ginkgoales, Taxales, Cycadales e Gnetales. A ordem Coniferales é dividida em 2 famílias: Taxaceae e Pinaceae (DALLIMORE & JACKSON, 1974).

Entretanto, segundo FOSTER & GIFFORD (1974), são 7 as famílias da ordem Coniferales: Pinaceae, Taxodiaceae, Cupressaceae, Araucariaceae, Podocarpaceae, Cephalotaxaceae e Taxaceae.

Dentro da família Pinaceae encontramos as espécies mais importantes do ponto de vista econômico para o setor florestal.

A espécie *Pinus taeda* L., conhecida como "Loblolly pine", é a espécie florestal mais importante no sul dos Estados Unidos. Carolus Linnaeus deu à espécie o nome científico onde "taeda" é a denominação antiga para pinheiros resinosos. É considerada a segunda mais importante espécie florestal do mundo, sendo que estes pinheiros do sul vem proporcionando através do século uma produção média de 10 bilhões de pés (30.48×10^9 m) de tábuas por ano, onde pelo menos metade é de *Pinus taeda* (ZOBEL, 1982).

No Brasil foi introduzida na década de 60 com grande sucesso devido a sua fácil adaptação, principalmente na região sul, nos Estados do Paraná e de Santa Catarina. Atualmente é uma espécie de grande importância econômica para o setor florestal do país.

De acordo com ZOBEL & DORMAN (1973), é uma espécie de grande adaptabilidade, boa qualidade da madeira e de fácil manejo. Devido a sua ampla distribuição, é geneticamente complexa e consiste de uma série de raças geográficas. Hibridiza livremente com várias outras espécies, de forma que é difícil definir uma espécie pura.

Segundo HALL (1980), para crescer em seu potencial, requer um bom ambiente e as melhores fontes genéticas possíveis. Quando ambos são satisfatórios, o potencial da espécie é enorme.

GUPTA & DURZAN (1991) apontam a espécie como a principal a ser manejada por sucessivas plantações florestais por 4 razões principais: (1) regeneração artificial fácil ou natural eficiente em áreas extensivas; (2) rápido crescimento numa ampla faixa de sítios; (3) facilidade de manuseio dos produtos na floresta e na indústria; (4) demanda fixa e preços crescentes para uma variedade de produtos industrializados de sua madeira.

A madeira é utilizada primariamente para a construção civil, papel e polpa, e indústria de chapeados e compensados. Também é utilizada em grande proporção para postes, cercas e estacas devido a sua excelente resistência e boas qualidades para tratamentos preservativos, e para vigas ou feixes laminados, tábuas de partículas, mobília, caixas, engradados, barcos, combustível e até brinquedos.

Segundo TARAS (1982), *Pinus taeda* continuará a contribuir para a área florestal como uma excelente matéria-prima.

As plantações de *Pinus taeda* ocupam cerca de 1,46 milhões de hectares no sudeste dos Estados Unidos, sendo a maior parte na Georgia, com 37%, seguido

pela Carolina do Sul, com 26%, Carolina do Norte, com 22%, Virginia, com 12% e Florida, com 3%.

Segundo ZOBEL & DORMAN (1973), *Pinus taeda* não foi tão bem sucedida e utilizada como uma espécie exótica como poderia ter sido. Vários plantios falharam devido às sementes obtidas serem de origem desconhecida e plantadas em ambientes aos quais não estavam adaptadas. Por isso, há uma opinião errada em várias áreas subtropicais, que a espécie mais plantada, *Pinus elliottii* é melhor e que *Pinus taeda* é inferior. No Brasil esta limitação já foi superada.

Devido às limitações apresentadas pelas técnicas convencionais de propagação vegetativa, atualmente há uma grande busca por métodos alternativos que possam otimizar os processos de propagação, assim como auxiliar em programas de melhoramento florestal visando aumento na produtividade.

Das técnicas alternativas, nos últimos 10 anos vem se destacando a biotecnologia, na forma de cultura de tecidos e células. Técnicas como a micropropagação e embriogênese somática vem se mostrando bem sucedidas, onde plantas inteiras vem sendo regeneradas a partir do cultivo *in vitro* de explantes selecionados.

A biotecnologia da embriogênese somática vem sendo estudada como uma alternativa de grande potencial principalmente em relação à preocupação com a redução das áreas florestais ao redor do mundo e à projeção de uma grande demanda por volta do século XXI. Os objetivos vem de encontro à rápida multiplicação de genótipos selecionados, de alto valor e com características desejáveis para o reflorestamento, auxiliando no aumento da produtividade florestal.

O presente trabalho tem por objetivos a definição de um protocolo viável para a obtenção de embriogênese somática e a análise dos fatores que afetam o processo e suas interações, além de fornecer subsídios para a utilização da técnica como uma ferramenta auxiliar nos processos de melhoramento florestal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Descrição da Espécie - *Pinus taeda* L.

2.1.1. Aspectos Gerais

Pinus taeda L. (Loblolly pine) também conhecido como "Arkansas pine", "North Carolina pine" e "oldfield pine" é a espécie florestal comercial mais importante no sul dos Estados Unidos, onde é dominante em cerca de 11,7 milhões de hectares e compõe mais da metade do volume de pinheiros existentes. É uma árvore de vida média, comparada a outras espécies, com rápido crescimento juvenil. Responde bem a tratamentos silviculturais e pode ser manejada em populações naturais adultas, em equilíbrio ou não, ou pode ser regenerada artificialmente e manejada em plantações (BAKER & LANGDON, 1990).

HARLOW & HARRAR (1950) descreve a espécie como sendo de tamanho médio a grande com 30 m de altura em média e 70 cm de diâmetro (os máximos observados foram respectivamente 55 m por 1,50 m). O tronco é longo e cilíndrico e a copa, apesar de aberta, é mais densa comparada a outras espécies. Quando jovem, desenvolve uma raiz principal curta, exceto em solos secos que favorecem o crescimento de um sistema radicular lateral extensivo. As acículas tem cerca de 20 cm de comprimento em média, em fascículos de 3 (ocasionalmente 2), finas, rígidas, amarelo-esverdeadas, geralmente com 2 canais de resina amplos na parte média. A casca é escamosa e quase preta em árvores jovens, variando de 19 mm até 50 mm em espessura, com presença de blocos irregulares de cor marrom e em árvores mais velhas, com placas escamosas marrom-avermelhadas.

Árvores de *Pinus taeda* atingem seu desenvolvimento máximo aos 150 anos, enquanto outras árvores podem ultrapassar a marca de 3 séculos.

2.1.2. Habitat Natural

A faixa nativa de *Pinus taeda* se estende por 14 estados, do sul de New Jersey até o centro da Flórida e oeste ao leste do Texas. Inclui a planície Atlântica, o planalto Piedmont e as extremidades sul do planalto Cumberland, a região montanhosa de Rim e o vale e as províncias montanhosas dos montes Appalachian. Não cresce naturalmente na planície inundada do rio Mississippi e é raro nas areias profundas e densas da planície baixa Atlântica e dunas dos estados da Carolina do Sul e do Norte. É uma espécie adaptável que tem sido plantada com sucesso ao longo da periferia de sua faixa natural e tem sido introduzida em outros continentes com vários graus de sucesso (BAKER & LANGDON, 1990).

Em termos de altitude, segundo HARLOW & HARRAR (1950), a espécie pode ser encontrada numa faixa entre 250 m até o nível do mar e ocasionalmente até 450 m.

2.1.3. Clima

O clima na faixa de ocorrência é de temperaturas quentes, úmido, com verões longos e quentes e invernos moderados. A precipitação média anual varia de 1000 a 1500 mm. O período com ausência de gelo varia de 5 meses na parte norte da faixa a 10 meses ao longo dos estados na costa sul. Temperaturas anuais médias variam de 13° a 24°C, média em julho na faixa de 27°C e frequentemente ultrapassa os 38°C; médias em janeiro por volta de 4° a 16°C, caindo ocasionalmente a -23°C nas partes norte e oeste da faixa (BAKER & LANGDON, 1990).

Segundo os autores acima citados, tanto no verão como no inverno, a temperatura dentro da faixa difere daquela fora da faixa. Há um grande número de dias com chuva. O fator limitante principal na extensão norte da faixa é provavelmente a baixa temperatura associada aos danos causados por gelo, neve e chuva com neve, e danos pelo frio durante florescimento. A limitação no oeste, em Oklahoma e Texas é devido a falta de adequada precipitação durante a estação de crescimento.

2.1.4. Solo e Topografia

Os solos na faixa nativa são predominantemente ultissóis. Pequenas áreas de entissóis e espodossóis são encontradas nos estados do sul e há alguns alfissóis através da região. *Pinus taeda* cresce numa ampla variedade destes solos, variando de aquults e aquods planos, pobremente drenados, da porção costeira da planície Atlântica aos relativamente secos psamments, udults e udalfs da porção interna da planície Atlântica, Piedmont e províncias montanhosas. O melhor crescimento dá-se em solos moderadamente ácidos, com drenagem superficial imperfeita a pobre, uma camada superficial espessa de textura média e um subsolo de textura fina; solos comuns nas áreas montanhosas da planície Atlântica e planície inundada e terraços de rios e riachos. A topografia na faixa de ocorrência varia de plana próximo a costa até montanhosa no interior (BAKER & LANGDON, 1990).

2.1.5. Biologia

2.1.5.1. Reprodução e Crescimento Inicial

De acordo com BAKER & LANGDON (1990), *Pinus taeda* é uma espécie monóica; flores masculinas se formam em grupos na parte superior da árvore, no ano precedente ao crescimento e as flores femininas se formam no ano de crescimento. As flores estaminadas que contém o pólen variam de 2,5 a 3,8 cm em comprimento e variam do verde-claro ao vermelho e amarelo, de acordo com o estágio de desenvolvimento. As flores pistiladas são geralmente ovóides e variam de 1,0 a 1,5 cm em comprimento, variando do verde-claro ao rosa-avermelhado, de acordo com o estágio de desenvolvimento.

O florescimento tem início em julho e agosto (verão na região de origem) numa gema quiescente, formada a partir de meados de junho até o início de julho. O estróbilo masculino forma-se nesta gema no final de julho e o feminino em agosto, mas não são distinguíveis até final de setembro ou outubro. Em outubro as gemas estaminadas se desenvolvem na base de uma gema vegetativa e as gemas pistiladas se desenvolvem no ápice de uma gema vegetativa algumas semanas após; ambas permanecem dormentes até início de fevereiro (BAKER & LANGDON, 1990).

A polinização ocorre na primavera, sendo a liberação do pólen dependente do acúmulo de 353°C em unidades de calor-dia, acima de 13°C, após primeiro de fevereiro (RAVEN et al., 1992).

O florescimento também depende da latitude, iniciando antes em latitudes baixas, podendo ocorrer entre 15 de fevereiro e 10 de abril. As flores estaminadas tendem a amadurecer antes das pistiladas, o que reduz chances de auto-polinização (BAKER & LANGDON, 1990). Além disso, como os cones femininos (com megasporângio) estão localizados nos ramos superiores e os masculinos (com microsporângio) nos inferiores, torna-se difícil o pólen ser lançado de uma posição inferior para outra superior, também dificultando a auto-polinização (RAVEN et al., 1992).

A fertilização do estróbilo pistilado ocorre na primavera do ano seguinte, cerca de 15 meses após a polinização, iniciando o desenvolvimento dos embriões (poliembrião). Geralmente somente um embrião se desenvolve completamente, mas cerca de 3 a 4% das sementes de *Pinus* spp. contém mais que um embrião e produzem 2 ou 3 seedlings na germinação (RAVEN et al., 1992).

Segundo BAKER & LANGDON (1990), o florescimento precoce não é comum, embora já tenha sido induzido em enxertias jovens (3 anos de idade). O fenômeno de indução de florescimento precoce em seedlings depende do crescimento vegetativo reduzido, de forma que gemas quiescentes são formadas no final da estação de crescimento para permitir a iniciação e diferenciação das estruturas reprodutivas. A formação de gemas quiescentes em seedlings e árvores jovens não ocorre durante este período porque 4 ou 5 fluxos de crescimento são comuns em árvores nesta idade. Com a senescência, o número de fluxos diminui, o que leva em parte ao florescimento crescente em árvores mais velhas. O florescimento também é regulado geneticamente e influenciado pela umidade (chuvas de maio-julho) e estresses nutricionais.

2.1.5.2. Produção e Disseminação de Sementes

A produção de sementes varia de acordo com a região fisiográfica, fatores climáticos e condições da árvore ou vigor. Apesar das flutuações na produção, *Pinus taeda* geralmente produz algumas sementes todo ano e boas produções ocorrem normalmente a intervalos de 3 a 6 anos. Um número maior que 198.000 sementes sadias por hectare é considerado boa produção; 74.000 a 198.000, média; e menos de 74.000, marginal, dependendo das características de viveiro e condições climáticas (BAKER & LANGDON, 1990).

Geralmente os cones maturam e as sementes amadurecem no início de outubro, após florescimento ou cerca de 26 meses após iniciação do estróbilo. Os cones maduros são marrom-avermelhado claros e variam de 7,5 a 15,0 cm em comprimento. São de forma cônica a ovóide-cilíndrico. Em cada escama há uma espinha triangular pontiaguda. Os cones masculinos são relativamente pequenos, 1 a 2 cm de comprimento, enquanto os femininos são maiores e mais complexos em sua estrutura (RAVEN et al., 1992). Cones individuais podem conter de menos de 20 até 200 sementes, sendo a percentagem de sadias variando de 15% a quase 100%. As sementes variam em tamanho, de 27.000 a 58.000 sementes em um quilograma, com média de 40.000/kg (BAKER & LANGDON, 1990).

Segundo os autores, a produção aumenta com a idade, tamanho e ausência de competição da copa. Por volta de 25 anos, em árvores bem espaçadas, são produzidas sementes o suficiente para regenerar um população; contudo, árvores aos 40 anos produzem 3 a 5 vezes mais.

A liberação das sementes se inicia em outubro, sendo o maior volume em novembro e início de dezembro. É favorecida por clima seco, quente, com ventos, e retardada por clima frio e úmido. A dispersão na mesma área ou em áreas adjacentes varia com a altura e o nível de estoque das árvores, magnitude de produção das sementes, terreno e condições climáticas quando da liberação. A distância efetiva varia de 60 a 90 m na direção do vento e 20 a 30 m em outras direções. A viabilidade das sementes varia com a produção e o mês de dispersão, sendo inferior em anos de baixa produção e dispersão no final da estação.

Após a dispersão, as sementes entram num período de dormência, relacionada com a impermeabilidade do tegumento que inibe a embebição e a absorção de oxigênio; inibidores químicos não são atuantes. A dormência é quebrada naturalmente com as sementes passando o período de inverno na superfície do solo sob as árvores. A germinação natural se inicia em março com temperaturas diárias de 18° a 27°C. Poucas sementes permanecem viáveis (não mais que 0,1%) para germinação no segundo ano após a dispersão. Dormência secundária pode ser induzida pelo manuseio. Estratificação úmida a frio por 30 a 90 dias, com temperatura variando de 3° a 5°C, é recomendada para quebra de dormência, para semeadura direta ou em viveiro (BAKER & LANGDON, 1990).

2.1.5.3. Desenvolvimento do Seedling

Segundo BAKER & LANGDON (1990), umidade é um fator crítico na germinação e estabelecimento do seedling (p. ex., chuvas de primavera). Solos compactados reduzem o crescimento radicular, sobrevivência do seedling e crescimento da parte aérea. A germinação diminui com a idade do banco de sementes e aumenta

com o conteúdo de argila do solo. Solos de textura mais pesadas proporcionam melhores viveiros, resultando em maior sobrevivência do seedling.

Seca é a causa maior de mortalidade dos seedlings, especialmente em áreas com chuvas escassas durante a estação de crescimento.

O crescimento é dependente de temperatura, comprimento do dia, umidade do solo, nutrientes, competição e fatores genéticos. A temperatura tem uma influência dominante no início do crescimento em altura na primavera, sendo ideal quando a diferença entre temperaturas diárias e noturnas é de 12° a 13°C.

A umidade do solo afeta o crescimento pelo efeito nas relações hídricas internas e processos fisiológicos vitais. A fotossíntese está relacionada com condições de luz e umidade do solo, que por sua vez são afetados pela competição com outras espécies. O crescimento ideal dá-se em solos úmidos e férteis devido aos efeitos da umidade na disponibilidade de nutrientes.

2.1.5.4. Reprodução Vegetativa

O enraizamento está relacionado com a idade da árvore, sendo melhor em estacas de árvores mais jovens. As técnicas e materiais utilizados para enraizamento de estacas são de importância crítica.

Alporquia tem sido um método bem sucedido para gemas e feixes de acículas, principalmente em árvores jovens. Enxertia é o método mais comum para a produção de árvores geneticamente uniformes, principalmente em pomares de sementes. O sucesso é geralmente grande, mas varia com o enxerto devido a problemas de incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto.

A produção de plântulas geneticamente uniformes a partir de cultura de tecidos é uma técnica promissora, sendo que pesquisas são conduzidas para desenvolver protocolos para a produção comercial de clones de *Pinus taeda*.

2.1.5.5. Problemas Fitossanitários

Segundo GUPTA & DURZAN (1991), são três as principais doenças que atacam *Pinus taeda*. A ferrugem, causada pelo fungo *Cronartium fusiforme*, é o principal problema nos E.U.A., sendo que os danos atingem 18% dos pinheiros existentes e 30% dos plantados, com os sintomas de rachaduras no tronco.

Podridão da raiz, causada pelo fungo *Fomes annosus*, é a segunda doença mais séria no sul dos E.U.A., sendo mais severa em plantações com mais de uma desrama.

O cancro, causado por *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wollenw. & Reink, tem recebido considerável atenção recentemente devido a severas epidemias em pomares de sementes na Carolina do Norte e Mississippi. Segundo KUHLMAN (1982), a morte devido ao cancro chegou a afetar 75% dos pinheiros com 6 anos de idade numa plantação de 120 hectares no leste da Carolina do Norte.

Pinus taeda é atacado por vários insetos, desde a fase de semente, passando pela maturidade, até como produto final.

2.2. Métodos Convencionais de Propagação e Melhoramento

GUPTA & DURZAN (1991) estabelecem que o método convencional de propagação de *Pinus taeda* é a semeadura natural ou o plantio de seedlings cultivados em viveiros. O reflorestamento através de semeadura artificial se encontra na faixa de um milhão de hectares por ano nos E.U.A.. O melhoramento é baseado na seleção, reprodução e teste de árvores para características superiores. A produção de linhagens de plantio com a melhor qualidade genética possível em quantidade suficiente é um passo essencial em programas de regeneração. As características economicamente mais importantes de *Pinus taeda* são controladas por vários genes. O melhoramento destas características é resultado da simples acumulação de mais genes desejáveis através de cruzamento e seleção.

Pomares de sementes são manejados de forma intensiva para a produção de sementes geneticamente melhoradas. Os ganhos genéticos das atividades de melhoramento da primeira geração são substanciais e agora a concentração está em gerações avançadas. Por exemplo, crescimento em volume pode ser aumentado em 12% na primeira geração híbrida, significando 32% de aumento no corte aos 25 anos.

Métodos convencionais de seleção, cruzamento e testes de progênie são úteis, mas muito lentos (25 a 30 anos) para espécies florestais, devido ao seus longos ciclos. O incremento de ganho genético por geração é pequeno. A reprodução sexuada, que envolve poliembriogênese, preserva somente algumas das características genéticas desejáveis de uma árvore selecionada.

Segundo MOTT (1987), a propagação vegetativa em massa é uma forma direta de selecionar características genéticas desejáveis de uma árvore madura. Porém, quando atingem a maturidade, estas árvores apresentam resistência aos métodos tradicionais de propagação vegetativa.

2.2.1. Estaquia

No processo de enraizamento de estacas é importante o uso de material jovem, uma vez que a maturidade gera inabilidade em regenerar um novo sistema radicular (HARTMANN & KESTER, 1991a,c). Segundo os autores, os seguintes fatores devem ser observados:

- seleção do material para estaquia
 1. condição fisiológica da muda;
 2. fator juvenilidade (idade da muda);
 3. tipo de estaca selecionada (parte da planta);
 4. presença de viroses;
 5. época do ano em que as estacas são retiradas.
- tratamento das estacas
 6. reguladores de crescimento;
 7. nutrientes minerais;
 8. fungicidas;
 9. cortes.

- condições ambientais durante o enraizamento
10. relações hídricas;
 11. temperatura;
 12. luz (intensidade, comprimento do dia, qualidade);
 13. meio de enraizamento.

Entretanto, DORMAN (1976), afirma que o sucesso de enraizamento de estacas é baixo e imprevisível.

O sucesso do processo ainda é dependente do controle de todos os fatores acima citados e de sua adequada combinação em função de ter assegurada uma alta taxa de enraizamento.

MOTT (1987), apresenta outro obstáculo ao melhoramento florestal através da estaquia. Os melhores resultados são obtidos com estacas no estágio juvenil, entretanto, a seleção de árvores matrizes de elite ocorre quando estas atingem o estágio adulto, quando a estaquia torna-se limitada.

2.2.2. Enxertia

MIROV (1967) estabelece que, para o sucesso da enxertia, as mudas devem ser vigorosas e a colocação do enxerto precisa.

O principal obstáculo à propagação via enxertia, é a rejeição ou incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto.

Segundo DORMAN (1976), a incompatibilidade ocorre em conexão com a enxertia em larga escala num pomar de sementes, mesmo ocorrendo entre mesma espécie, havendo falha na formação de uma perfeita união; falha esta que possivelmente pode ser atribuída ao bloqueio do floema.

Na região de união, segundo HARTMANN & KESTER (1991d), forma-se um calo, porém o processo é muitas vezes inconsistente, e os resultados desapontadores, com baixa percentagem ou completa ausência de união. Os fatores que influenciam o sucesso da enxertia são:

- condições de temperatura, umidade e oxigênio (aeração) durante e após a enxertia;
- atividade de crescimento do porta-enxerto;
- técnica de propagação;
- contaminação por vírus, insetos ou doenças;
- substâncias de crescimento na cicatrização da união.

2.2.3. Alporquia

Segundo DORMAN (1976), a alporquia não é viável, uma vez que em árvores com mais de 3 anos o enraizamento é reduzido, além de ser um processo de difícil execução e manuseio, não adequado para um pomar de sementes.

HARTMANN & KESTER (1991b) citam os fatores que afetam a regeneração de plantas por alporquia:

- a. nutrição;
- b. tratamento dos ramos;
- c. exclusão da luz;
- d. condicionamento fisiológico;
- e. rejuvenescimento;

Além destes, umidade contínua, boa aeração e temperatura moderada na zona de enraizamento também são fundamentais para o sucesso do processo.

CAMERON & THOMSON (1969) demonstraram as dificuldades de enraizamento em alporques e estacas de *Pinus radiata*.

2.3. Métodos não convencionais de propagação e melhoramento

2.3.1. Aspectos gerais

A incorporação de métodos não convencionais, como cultura de células e tecidos para a propagação em massa de *Pinus taeda*, auxilia na remoção de barreiras existentes no processo de melhoramento e domesticação da espécie, mesmo ainda não sendo viáveis economicamente.

SINNOT (1960) estabeleceu três categorias de atividade regenerativa envolvendo abordagens convencionais e não-convencionais:

a. reconstituição: reorganização de tecido embrionário pela qual sua estrutura original é reformada, por exemplo, uma porção do embrião original reconstitui, por clivagem, um embrião completo. A poliembriogênese por clivagem em gimnospermas é um exemplo. O processo de multiplicação poliembriônica pode ser capturado através da cultura não-convencional da massa embrional-suspensor (MES). As células são reestruturadas em novos embriões, de acordo com o desenvolvimento, sem a necessidade de calos (GUPTA & DURZAN, 1987a; DURZAN & GUPTA, 1987).

Esta abordagem explora sequências de desenvolvimento que ocorrem na semente. O processo começa pelo transplante da MES em placas com agar, suplementos hormonais e nutrientes. O embrião zigótico é resgatado e embriões múltiplos são reconstituídos em culturas de suspensão de células cultivadas no escuro com todos os aspectos de desenvolvimento único de poliembriologia de coníferas.

b. restauração: descreve uma ampla faixa de casos convencionais onde tecidos ausentes são recolocados através do surgimento de atividade meristemática em áreas adjacentes; por exemplo, enraizamento de estacas ou de brotações micropropagadas. As células na porção terminal são dediferenciadas e rediferenciadas. O desenvolvimento segue de acordo com o programa normal para a parte restaurada (GUPTA & DURZAN, 1991). A propagação em massa tem sido conseguida pelo enraizamento de estacas para alguns genótipos superiores (BUIJTENEN et al., 1975; BUIJTENEN & SHAW, 1985). Contudo, o sucesso é restrito a indivíduos juvenis, seedlings com 1 a 2 anos, mas não de árvores elite selecionadas. Para *Pinus taeda*, o sucesso de enraizamento tem sido de 50%, com 1 a 2 anos (BUIJTENEN et al., 1975).

Segundo GREENWOOD (1981), a percentagem de enraizamento diminui com a idade da árvore.

c. regeneração adventícia ou reprodutiva: envolve a separação não convencional de parte do corpo do vegetal pela excisão de um explante. Uma nova planta representando a árvore matriz, ou nova geração, é regenerada por organogênese ou por embriogênese somática adventícia.

Estes processos de propagação vegetativa são adventícios no sentido em que células de um hipocótilo ou cotilédone não produzem embriões normalmente, mas podem ser induzidas a fazê-lo por dediferenciação, indução e diferenciação (rediferenciação) de células em explantes e calos. O termo "regeneração reprodutiva" é confuso e caiu em desuso quando da descrição de propagação vegetativa.

Micropropagação é atualmente baseada na retirada de explantes de fases juvenis ou embriônicas onde é mais provável a ocorrência de organogênese com

sucesso. Através da reversão à juvenilidade de tecidos, a micropropagação pode ser estendida a explantes de árvores maduras (GUPTA & DURZAN, 1987b).

A reversão à juvenilidade pode ser obtida pelos seguintes processos (GONCALVES, 1982; AHUJA, 1987):

- a. tratamento térmico (frio ou calor);
- b. tratamento com raio X;
- c. aplicação de ácido giberélico;
- d. propagação vegetativa sucessiva (enxertia seriada, subcultivo seriado de explantes *in vitro*);
- e. poda drástica (gemas apicais);
- f. neodiferenciação de gemas (indução de gemas adventícias);
- g. apomixia;
- h. tratamento de gemas dormentes (quebra de inibidores de rejuvenescimento);
- i. meiose para células.

Esse tipo de regeneração reprodutiva pode envolver fases e padrões embriogênicos, mas estes não são sempre completos ou verdadeiros quando comparados com o desenvolvimento dos embriões zigóticos naturais ou com reconstituição por clivagem e poliembriogênese de gemas. Devido a escolha do explante e a necessidade de dediferenciação, indução e rediferenciação, os produtos regenerados são geralmente precoces em desenvolvimento e geneticamente aberrantes, quando um calo é selecionado.

GUPTA & DURZAN (1986a,b) citam a regeneração de embriões somáticos em *Pinus lambertiana*, por poliembriogênese de um calo, onde o termo "calo" não é apropriado, uma vez reconhecido e redefinido mais tarde, para *Pinus taeda*, como uma massa embriônica-suspensora transplantada (GUPTA & DURZAN, 1987a).

Dos processos acima mencionados, a reconstituição por embriogênese somática apresenta características únicas:

- a. o transplante é o processo mais utilizado do que a excisão;
- b. o processo é independente de um calo ou da necessidade de dediferenciar e rediferenciar células *in vitro*;
- c. em termos de poliembriologia de coníferas, é o padrão mais verdadeiro em desenvolvimento;
- d. o processo é uma parte natural da estratégia reprodutiva evolucionária das gimnospermas.

Em poliembriogênese, várias das massas embriônica-suspensoras transplantadas podem não necessitar inicialmente de reguladores de crescimento sintéticos suplementares, devido a sua superioridade genética e níveis endógenos naturalmente altos (BECWAR et al., 1990; GUPTA e DURZAN, 1991).

Eventualmente, hormônios são adicionados para continuar a proliferação da massa embrional-suspensor. Os hormônios são reduzidos ou eliminados posteriormente para dar lançamento ao desenvolvimento do embrião individual em massas poliembriônicas.

Porém, GUPTA & DURZAN (1991) afirmam que muito pouco se sabe sobre as variâncias genéticas e estabilidade das árvores regeneradas por

poliembriogênese. Uma estabilidade maior é esperada associada com o processo natural de reconstituição, uma vez que não há necessidade de indução e rediferenciação de células de um calo ou utilização de explantes para embriões adventícia ou poliembriões.

2.3.2. Cultura de Tecidos

O potencial da micropropagação em melhoramento florestal já foi revisado antes (DURZAN & CAMPBELL, 1974; DURZAN, 1980; BAJAJ, 1986; MOTT, 1987; WEBB & VILLALOBOS, 1987 e AMERSON et al., 1988) e mais recentemente para embriogênese somática e poliembriogênese (DURZAN, 1988a,b e BONGA & ADERKAS, 1992).

SHARP et al. (1983) citam a importância das estratégias para propagação *in vitro*, em larga escala, visando clonagem, erradicação de doenças e cruzamentos em cultura de tecidos, cujo programa envolve: (a) complementação de um programa convencional de cruzamentos através da clonagem de novas variedades ou das já existentes; (b) desenvolvimento de novos cultivares a partir de cultivares existentes e espécies selvagens através de cultura e resgate de embriões ou fusão de protoplastos; (c) erradicação de doenças através da cultura de meristemas.

BHOJWANI & RAZDAN (1986) apresentam uma série de considerações justificando a propagação *in vitro*, principalmente para espécies cuja propagação por métodos convencionais é inviável.

Segundo BONGA (1987a,b) na otimização do processo de clonagem *in vitro* de espécies lenhosas, deve-se considerar a juvenilidade dos tecidos, dando uso ao processo de reversão à juvenilidade

(GONÇALVES, 1982; AHUJA, 1987).

GIACOMETTI (1990) destaca a importância da biotecnologia na propagação comercial e industrial de plantas, no melhoramento genético, no manejo, no intercâmbio e conservação de germoplasma e em pesquisas e produção industrial *in vitro* de compostos secundários.

Segundo BECWAR et al. (1988), o longo ciclo de vida das coníferas retarda o melhoramento genético pelo processo tradicional de cruzamentos sexuais. As técnicas de propagação clonal mostram promessa considerável para a obtenção de um melhoramento mais acelerado e aumento de produtividade.

GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990) apresentam as três formas de propagação *in vitro* (micropropagação): (1) multiplicação através da proliferação de gemas axilares; (2) multiplicação através da indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (fase de calo); (3) multiplicação através de embriogênese somática.

Segundo GUPTA & DURZAN (1991), os métodos de cultura de tecidos e células oferecem uma nova forma de propagação clonal de genótipos superiores com a vantagem que em ambos os casos as variâncias genéticas aditivas e não aditivas são capturadas. A diferença dos métodos convencionais de propagação vegetativa é que células, explantes ou transplantes são utilizados como o material inicial e o processo é conduzido sob condições assépticas definidas.

SOMMER & CALDAS (1981) apresentam os princípios de laboratório aplicados à cultura de tecidos de espécies florestais, citando o pesquisador como principal limitação no processo, devendo este possuir habilidade de pesquisa, leitura e avaliação crítica da literatura, além de boas técnicas de esterilização.

Dois fatores a serem acrescentados às qualidades do pesquisador e que são de fundamental importância são a persistência e a criatividade, não se limitando à simples repetição de procedimentos padronizados.

Segundo SOMMER (1991) o grande desafio para a biotecnologia aplicada às espécies florestais é a obtenção de informações suficientes sobre o genoma das espécies, de forma que o melhoramento possa mudar de uma tecnologia empírica para uma corrente definida da genética, o que não será obtido fácil e rapidamente.

Segundo DURZAN (1980, 1988b) a seleção do explante inicial é consideração fundamental na qualidade do produto final. Este fato foi demonstrado por SILVA (1989) em seu trabalho sobre morfogênese *in vitro* de diferentes tipos de explantes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

FERRARI (1986) realizou um estudo do comportamento de várias espécies de *Pinus* para micropropagação e, apesar dos problemas ainda presentes como contaminação, oxidação e balanço nutricional do meio, os resultados apresentados foram promissores.

2.3.3. Embriogênese somática

Embriogênese somática é um método de cultura de tecidos para propagação vegetativa. O termo "somático" refere-se ao fato do embrião desenvolver-se assexuadamente de tecido vegetativo (somático) e não como resultado de fertilização. Considerando as técnicas correntes de cultura de tecidos, como multiplicação de brotações e organogênese, o principal fator limitante para espécies florestais tem sido o custo dos seedlings, ausência de métodos eficientes de micropropagação e baixa performance dos propágulos no campo.

Vários trabalhos definem a técnica de embriogênese somática como uma ferramenta promissora, de grande potencial para programas de reflorestamento e melhoramento (GUPTA et al., 1987a,b; ATTREE & FOWKE, 1991; ATTREE & FOWKE, 1993; BORNMAN, 1993; GUPTA et al., 1993; NAGMANI et al., 1993; RUAUD, 1993 e SUTTON, 1993).

Segundo BORNMAN (1993) é uma técnica de propagação clonal bastante promissora para a produção econômica de um grande número de propágulos. Os embriões somáticos podem ser produzidos de células, tomando as técnicas de cultura de células altamente eficientes, para fins de manutenção e produção; além disso os embriões somáticos podem ser encapsulados na forma de sementes artificiais.

2.4. Embriogênese somática em coníferas

A indução de embriogênese somática em gimnospermas é de origem recente, sendo primeiramente relatada para *Picea abies*. Desde então cerca de 75 trabalhos foram publicados sobre o assunto (BORNMAN, 1993).

2.4.1. Aspectos gerais

PASQUAL & PINTO (1988) citam que a cultura de embriões permite estudos dos fatores que afetam o crescimento dos embriões e de primórdios de órgãos no seedling e os aspectos metabólicos e bioquímicos de germinação e dormência. O cultivo *in vitro* de embriões pode ser útil para o estudo de necessidades nutricionais e físicas para o desenvolvimento do embrião.

A embriogênese somática pode se dar de forma direta ou indireta, sendo que na maioria dos sistemas ela ocorre de forma indireta. Calos embriogênicos são induzidos e mantidos ao longo da multiplicação. Na superfície dos calos, são formados os

embriões somáticos. Na forma direta, a formação dos embriões somáticos dá-se diretamente sobre a superfície dos explantes, sem a fase de calo.

Segundo ALMEIDA (1991), no contexto de morfogênese, os embriões somáticos, assim como órgãos adventícios, são originados por alterações no crescimento e/ou desenvolvimento que produzem mudanças estruturais nas células e nos tecidos. No processo, CALDAS & TORRES (1990) definiram a formação de uma estrutura semelhante ao embrião, com eixo polar (radícula-parte aérea) completo.

Esta estrutura é geralmente denominada pró-embrião, massa pró-embrional ou massa embrional-suspensor. SANTOS (1987), definiu esta estrutura como embrióide, na tentativa de diferenciá-la do termo embrião, mas ela não parece ter sido utilizada com frequência.

TAUTORUS et al. (1991) apresentam uma descrição dos diferentes estágios do embrião somático:

Estágio 1. embriões somáticos com suspensor translúcido, ápice embrional denso, com perfil levemente irregular.

Estágio 2. embrião distinguível, perfil suave, opaco, creme a amarelo pálido, ligado ao suspensor.

Estágio 3. embrião com pequenos cotilédones reunidos ao redor de um meristema central, com ou sem um suspensor, semelhante a um embrião zigótico, creme a verde pálido.

Estágio 4a (inicial). plântula com cotilédones distintos, parcialmente alongados, reunidos ao redor de um meristema central, com alguma alongação do hipocótilo, verde.

Estágio 4b (final). plântula com cotilédones e hipocótilo alongados, com desenvolvimento rudimentar da radícula, verde.

Segundo WANN (1989), o princípio básico para o controle da morfogênese *in vitro* tem sido através da manipulação do ambiente físico, nutricional e hormonal.

TAUTORUS et al. (1991) apresentam os fatores que afetam a embriogênese somática. A seleção do explante e as condições de cultura representam um fator importante, uma vez que vários tecidos da mesma planta ou tecidos em diferentes estágios de desenvolvimento podem diferir em sua resposta, quando cultivados *in vitro* (ROBERTS et al., 1989).

A época de coleta do explante também é importante, pois há indícios que existe um período de desenvolvimento em embriões zigóticos no qual estes são de alta resposta à formação de tecido embriogênico (BECWAR et al., 1988).

Modificações nos componentes do meio e condições de cultivo podem também alterar a indução de tecido embriogênico, com influência dos seguintes fatores: regimes de luz; concentração do meio basal, particularmente sacarose; nível de nitrogênio e composição; elementos minerais, agar, reguladores de crescimento e pH (TAUTORUS et al., 1991).

Entretanto, segundo YI (1989) a escolha do meio e do regulador de crescimento é arbitrária, uma vez que as interações fisiológicas e bioquímicas entre explantes e nutrientes não são ainda bem compreendidas.

Há também o fator genótipo, pois diferentes genótipos dentro de uma mesma espécie apresentam diferentes requerimentos de cultura para a produção de tecido embriogênico (TAUTORUS et al., 1991).

Segundo BORNMAN (1993), na fase de explante, o melhor material para a iniciação do tecido embriogênico em espécies de coníferas tem sido o embrião zigótico imaturo. A iniciação geralmente requer a presença de auxina e citocinina, mas há exemplos onde apenas um destes reguladores já é o suficiente. Entretanto, alguns autores sugerem que o megagametófito proporciona os reguladores de crescimento necessários à indução.

Sacarose também tem sido utilizada nos meios, além de caseína hidrolisada que supostamente aumenta a indução de embriogênese somática a partir de embriões imaturos. A indução dá-se com maior frequência no escuro e os meios de cultura utilizados na metade de sua concentração normal.

A manutenção dos tecidos embriogênicos envolve o subcultivo a intervalos definidos de tecidos embriogênicos morfogeneticamente distintos cuidadosamente selecionados. Durante a fase de proliferação, o tecido embriogênico se multiplica continuamente, subcultivado regularmente para meio sólido ou líquido, contendo níveis reduzidos de auxina e citocinina. Por analogia ao embrião zigótico, o estágio de desenvolvimento do embrião somático durante as fases de iniciação, manutenção e proliferação podem ser descritos como as da embriogênese inicial (BORNMAN, 1993).

As espécies de *Pinus* têm mostrado frequências de indução na ordem de 5%. Essas baixas frequências, associadas com a baixa disponibilidade anual de

explantos adequados, têm impedido a rápida otimização dos meios e das condições para essas espécies.

Segundo dados acumulados de uma pesquisa realizada por BORNMAN (1993) sobre embriogênese somática em angiospermas e gimnospermas, a conversão de embriões somáticos em sementes somáticas viáveis está limitada pela incompleta maturação deste.

A fase de maturação, segundo BORNMAN (1993), é uma das mais críticas, senão a mais, porque durante esta fase são produzidos os embriões somáticos germináveis, completamente desenvolvidos. Para regular a maturação é utilizado o ABA (ácido abscísico), embora seu requerimento não é absoluto. O sucesso da fase de germinação depende da maturação sincronizada e envolve expansão dos cotilédones, alongamento do eixo hipocótilo-raiz e emergência da radícula numa plântula somática semelhante a um seedling ou embling. Os fatores que afetam a maturação são ABA exógeno, prolina, sacarose, frio e dessecação. Embora obscuro, o ABA regula a maturação por diversas formas: inibindo a germinação precoce; conferindo tolerância a dessecação e promovendo o acúmulo de proteínas e lipídeos de reserva. Assim, induz uma maturação sincronizada que resulta, na sua retirada, numa germinação uniforme e em alta frequência.

A figura 1 mostra a sequência de 7 fases essenciais no estabelecimento de plantas derivadas de embriões somáticos. A figura 2 mostra as fases com os requerimentos químicos e físicos.

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA: REGENERAÇÃO DA PLANTA

FASE

EXPLANTE	Embrião zigótico imaturo
	Embrião zigótico maduro
	Cotilédones
INICIAÇÃO	Calos
	Tecido embriogênico
MANUTENÇÃO	Tecido embriogênico
PROLIFERAÇÃO	Proliferação contínua
	de tecido embriogênico
MATURAÇÃO	Desenvolvimento de embriões
	somáticos precoces até o
	estágio maduro (emblings)
GERMINAÇÃO	Crescimento de radícula e
	cotilédones de embriões
	somáticos
TRANSPLANTE	Plântula (emplet)

Figura 1. Sequência das fases essenciais no estabelecimento de plantas derivadas de embriogênese somática. Fonte: BORNMAN, 1993.

REQUERIMENTOS QUÍMICOS E FÍSICOS

FASE

INICIAÇÃO	Auxina (2,4-D; ANA) e/ou citocinina (BAP), baixa sacarose, escuro.
MANUTENÇÃO	Auxina, citocinina, baixa sacarose, escuro.
PROLIFERAÇÃO	Auxina, citocinina, sacarose mais elevada, luz.
MATURAÇÃO	Auxina, citocinina, ácido abscísico (ABA), luz.
GERMINAÇÃO	Primeira dessecação por 1 a 2 semanas, então germinação e meio basal em meia concentração por 4-5 semanas.
TRANSPLANTE	Rustificação

Figura 2. Requerimentos químicos e físicos para cada fase do processo de embriogênese somática. Fonte: BORNMAN, 1993.

Em coníferas, as culturas de embriões são induzidas de embriões zigóticos ou germinantes jovens, não sendo ainda possível a indução a partir de explantes mais velhos (ATTREE et al., 1991; TAUTORUS et al., 1991; ROBERTS et al., 1993).

Segundo SUTTON et al. (1993), a embriogênese somática faz o papel do enraizamento de estacas com respeito a multiplicação de progênies. As vantagens do processo sobre a estaquia dependem da taxa de multiplicação que pode ser conseguida de uma fonte limitada de sementes e do custo relativo de produção.

Na propagação de clones de elite, os indivíduos devem ser mantidos no estágio juvenil, capaz de regeneração por 10 anos ou mais, a fim de testar e selecionar os clones no campo para subsequente distribuição. Sendo assim, é a única técnica adequada, uma vez que culturas embriogênicas podem ser criopreservadas por longos períodos.

As características adicionadas que podem ser adquiridas através da embriogênese somática incluem produtividade, qualidade da madeira e resistência a doenças e pragas.

Segundo BORNMAN (1993), com a crescente produção florestal ao redor do mundo, concomitante com a demanda por genótipos de qualidade superior, atenção tem sido dada a produção de fenótipos selecionados por micropropagação. Das técnicas correntemente disponíveis em micropropagação, produção de brotações axilares, organogênese e embriogênese somática, esta última apresenta o maior potencial.

O uso de sementes sintéticas (encapsulamento do embrião somático) é uma técnica que pode permitir a produção em escala de cultivares que não podem ser produzidos comercialmente por outros métodos.

ATTREE & FOWKE (1993) afirmam que é improvável que a tecnologia de sementes sintéticas tome o lugar das estratégias convencionais de melhoramento, mas ambas podem ser utilizadas em conjunto. Para MULLIN & PARK (1992), a produção clonal acelera a distribuição de material geneticamente melhorado permitindo ganhos genéticos adicionais a cada geração.

As aplicações para a tecnologia de sementes sintéticas podem ser, de acordo com ATTREE & FOWKE (1993):

1. clonagem de árvores com alta produtividade;
2. produção de sementes sintéticas para espécies com baixa produção de sementes;
3. clonagem de variedades mais rústicas, resistentes a estresses ambientais (congelamento ou seca);
4. clonagem de árvores resistentes a pragas e doenças;
5. conservação de germoplasma de espécies raras ou em extinção;
6. propagação de variedades ornamentais raras.

A técnica da embriogênese somática também pode ser utilizada para estudos do processo de embriogênese em coníferas, como os fatores que ativam a sequência temporal correta da expressão gênica, presente no mecanismo molecular de desenvolvimento.

Técnicas atuais em biologia molecular podem ser utilizadas para a compreensão do controle genético da embriogênese, em cada estágio de desenvolvimento do embrião.

Segundo SUTTON et al. (1993), os benefícios da embriogênese somática incluem a multiplicação de progênes superiores e a seleção de clones elite, com aquisição de uma maior proporção do ganho da variação epistática, aditiva e dominância.

SANTOS (1987) já apontava que algumas dificuldades deveriam ser vencidas, como por exemplo, garantia de estabilidade genética, ausência de sincronização na embriogênese, armazenamento de sementes artificiais e mecanização do processo.

Segundo TAUTHURUS et al. (1991) a produção muito baixa de plântulas originadas de embriões somáticos da maioria das espécies também é um problema para a utilização comercial da tecnologia.

GUPTA et al. (1993) também colocam o problema, citando que os produtos do desenvolvimento do embrião não são uniformes, sendo que os embriões resultantes podem variar de tamanho, forma, estágio e morfologia. A sincronia de desenvolvimento causa outro problema maior em sistemas embriogênicos estabelecidos; ou seja, muitos embriões estão unidos uns aos outros na extremidade do suspensor e a separação e seleção dos embriões individuais são trabalhosas.

SUTTON et al. (1993) conclui que, para se utilizar a embriogênese somática operacionalmente, os custos de produção, balanceados com os benefícios do ganho genético, devem ser comparáveis ao custo de produção dos seedlings.

Considerando que os embriões somáticos podem ser manuseados em grandes volumes, a opção mais atrativa é o uso de sementes artificiais, que poderiam ser semeadas diretamente no solo.

Trabalhos adicionais são necessários com o objetivo de se buscar o desenvolvimento sincronizado de raiz e parte aérea, assim como protocolos de aclimação melhorados para se reduzir o estresse e aumentar o crescimento e sobrevivência no campo. Estudos sobre o controle da umidade, luz e temperatura durante a rustificação também são importantes.

Outra questão importante a ser estudada é em relação aos métodos de análise quantitativa. Segundo TULECKE (1987), os métodos conhecidos são difíceis de se aplicar para sistemas embriogênicos devido à falta de homogeneidade das populações de células ou dos estágios de desenvolvimento. É necessário a obtenção de um melhor método de análise quantitativa, principalmente da frequência de indução a partir do explante original, da frequência de ocorrência numa linha embriogênica, do critério utilizado para seleção, da taxa de progresso dos embriões somáticos através do seu desenvolvimento, incluindo germinação, crescimento da plântula, transplante para o solo, rustificação e crescimento no campo.

GUPTA et al. (1993) descrevem o progresso da tecnologia de embriogênese somática e mostram o potencial para sua aplicação comercial para fins de reflorestamento por volta do ano 2000.

Também NAGMANI et al. (1993) identificam uma oportunidade para o desenvolvimento de um protocolo eficiente para regeneração rápida de plantas ou tecidos que podem ser utilizados para experimentos com transformação genética.

2.4.2. Aplicações

MUDGE (1986) obteve o desenvolvimento de brotações sobre embriões intactos, via formação de gemas adventícias, a partir de embriões de *Pinus mugo* Turra var. *mugo*, com 2 semanas até 4 meses de idade, cultivados *in vitro* em meio de cultura contendo 44,4 mM BAP e 0,05 mM ANA. O alongamento das brotações foi obtido em meio isento de reguladores de crescimento, contendo 1 g/l de carvão ativado, e o enraizamento foi obtido após tratamento com 0,8% IBA.

GUPTA & DURZAN (1987a) relatam avanços importantes que distinguem seus trabalhos anteriores de trabalhos atuais sobre embriogênese somática, apresentando a regeneração de plântulas de *Pinus taeda* por poliembriogênese somática. Embriões somáticos foram encapsulados e armazenados em gel alginato ou em nitrogênio líquido.

Trabalhando com calos embriogênicos de *Picea abies* e *Pinus taeda*, GUPTA & DURZAN (1987b) desenvolveram um método para a possível criopreservação destes calos à -196°C e a regeneração de embriões somáticos de células descongeladas de massas suspensor-embriônicas subcultivadas. Os resultados sugerem que o armazenamento a longo termo de linhas de células embriogênicas em nitrogênio líquido pode ser factível para programas de melhoramento florestal em circunstâncias onde testes de progênie podem levar vários anos.

HAKMAN & FOWKE (1987) iniciaram calos embriogênicos de embriões imaturos de *Picea glauca* e *Picea mariana* cultivados em meios definidos com 2,4-D, BA e 1% de sacarose. Os embriões somáticos obtidos foram estimulados se desenvolvendo em plântulas.

KOGSTRUP et al. (1988) obtiveram embriões somáticos a partir de massas suspensor-embrionais, de embriões imaturos de *Picea sitchensis*, cultivados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado, com 2,4-D, BAP, cinetina e fonte orgânica. BERCETCHE (1989) obteve calos embriogênicos, formados de embriões imaturos e cotilédones de *Picea abies*, em meio contendo 5 mM de 2,4-D, 2 mM de BAP e 2 mM de cinetina, por 15-16 meses. Estes calos, cultivados por 3 dias em meio com carvão ativado, foram transferidos para meios com ABA (1 ou 2 mM) e sacarose (3 a 6%). Embriões somáticos foram isolados e cultivados em meio líquido com carvão ativado (1%), resultando em plântulas com brotações e raízes desenvolvidas, cuja produção final foi de 50 a 60%.

FRAMPTON & JETT (1989) mostram uma aplicação importante em seu trabalho, onde foi avaliada a densidade específica da madeira juvenil de plântulas de *Pinus taeda* de cultura de tecidos e de seedlings da mesma espécie. A densidade específica da madeira de plantações de *Pinus taeda* é extremamente heterogênea, devido ao uso de lotes de sementes misturados, de pomares de sementes polinizados pelo vento. Pelo estabelecimento de plantações clonais, um melhoramento substancial é antecipado na uniformidade da densidade específica da madeira.

Utilizando como explantes embriões imaturos de 4 diferentes genótipos de *Pinus elliottii*, JAIN et al. (1989) induziram calos embriogênicos. Para desenvolvimento de embriões somáticos estes calos foram cultivados em meios contendo : 5mM 2,4-D e 1mM BAP; 1mM 2,4-D e 0,5mM BAP; 1mM ABA. Os resultados indicaram que genótipo e meio de cultura são fatores importantes para a produção de calos embriogênicos somáticos. Os calos embriogênicos foram descritos como sendo brancos, brilhantes, translúcidos e muscilaginosos, contendo numerosos embriões somáticos de diferentes tamanhos, facilmente distinguíveis de calos não embriogênicos.

KLIMASZEWSKA (1989) obteve calos embriogênicos em híbridos de *Larix* spp. (*Larix leptolepis* X *Larix decidua*) a partir de embriões zigóticos imaturos, retirados no estágio precotiledonar. Os "embrióides" obtidos geminaram e produziram plântulas (30%), sendo que 35 plantas foram estabelecidas em solo.

BECWAR et al. (1990), utilizando embriões zigóticos imaturos de 10 clones de *Pinus taeda* como explante (isolados ou com megagametófito intacto), estudaram o potencial de formação de tecido embriogênico da região do suspensor dos embriões zigóticos. De 14.000 explantes cultivados, culturas embriogênicas foram iniciadas de explantes de 8 clones, sendo que 2 clones não apresentaram resposta. A mais alta frequência de iniciação foi de 5%, havendo diferenças entre os clones. Essas diferenças podem ser devido a variação genética no potencial embriogênico dos clones testados, ou pode simplesmente refletir variação nos requerimentos do meio entre explantes de diferentes clones.

LAINE & DAVID (1990) em trabalho semelhante obtiveram embriogênese somática em embriões imaturos de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, cultivados em meios com 2,4-D, BAP e/ou cinetina. O estágio inicial de poliembrião do embrião zigótico em desenvolvimento foi o estágio ótimo para embriogênese somática. Diferentes linhas de calos (diferentes genótipos) expressaram requerimentos nutricionais distintos para crescimento. Embriões completamente diferenciados, com cotilédones e hipocótilo, foram obtidos.

TAUTORUS et al. (1990) obtiveram calos embriogênicos em *Picea mariana* Mill., iniciados *in vitro* a partir de embriões zigóticos imaturos, coletados durante o período de maturação, provenientes de sementes armazenadas por 13 anos. A regeneração de embriões somáticos a partir dos protoplastos da espécie permite a utilização de técnicas para transformação genética ou hibridação somática para um eventual melhoramento vegetal.

A partir de cotilédones de seedlings jovens de *Picea abies*, RUAUD (1991) induziu gemas adventícias que favorecem a formação de calos embriogênicos. Para cada fase, indução, expressão e proliferação de calos e gemas, foram utilizados diferentes meios de cultura assim como diferentes condições ambientais (luz e temperatura).

NAGMANI et al. (1993) cultivaram embriões zigóticos isolados e megagametófitos contendo embriões zigóticos de *Pinus palustris* em 2 meios basais, suplementados com 3 diferentes fontes de carbono (glucose, maltose e sacarose), adicionadas individualmente ao meio em 4 níveis cada, além de vários níveis de 2,4-D e BAP.

A iniciação de tecido embriogênico foi mais frequente de explantes coletados em 14 de julho de 1992, quando os embriões zigóticos dentro dos megagametófitos estavam no estágio pré-cotiledonar. Foram iniciadas 33 culturas embriogênicas de 944 explantes cultivados (3,5%). Dos 192 explantes em meio basal sem reguladores de crescimento, 1 produziu tecido embriogênico, que mostrou vários embriões somáticos nos estágios 1 e 2 de desenvolvimento (TAUTORUS et al., 1991).

JONES et al. (1993) obtiveram calos embriogênicos de megagametófitos contendo embriões zigóticos imaturos de *Pinus patula*. Uma média de 2,6% dos gametófitos contendo pelo menos um embrião produziram tecido embriogênico. A maior taxa de indução ocorreu em meios basais suplementados com 0,5 mg/l de BAP e 3,0 mg/l de 2,4-D, utilizando glutamina como a fonte principal de nitrogênio. Exames histológicos demonstraram que 3 tipos distintos de tecidos foram produzidos. Um tecido translúcido e branco, muscilaginoso, embriogênico; um tecido compacto, cristalino, não embriogênico; e uma mistura de ambos, resultando na produção de esferoblastos. Esferoblastos são diferentes de embriões somáticos verdadeiros, pois não há desenvolvimento em embrião (WANN, 1989).

RUAUD (1993) obteve iniciação de embriogênese somática de cotilédones de plantas a partir de 7 até 56 dias de idade, derivadas de embriões somáticos (plantas somáticas), de *Picea abies*. A frequência de embriogênese somática diminuiu com a idade, sendo que em plantas zigóticas é de zero aos 56 dias de idade; já para plantas somáticas de mesma idade ainda há uma resposta significativa por volta de 10%. Também foram obtidas culturas embriogênicas de acículas de plantas somáticas que mostraram competência. As culturas embriogênicas de segunda geração (de órgãos de

plantas somáticas) foram multiplicadas. Embriões somáticos resultantes de embriogênese somática de cotilédones, de cotilédones ou de acículas de plantas somáticas foram amadurecidos e convertidos em plântulas.

Milhares de árvores de coníferas, assim como de outras espécies, têm sido produzidas e estão agora sendo testadas no campo. Dados de campo mostram que ganhos genéticos são possíveis através da propagação por cultura de tecidos e células, contudo, o alto custo ainda é um fator limitante para a produção em escala comercial. Novos métodos de baixo custo devem ser desenvolvidos para a propagação em massa de árvores elite maduras.

Segundo GUPTA & DURZAN (1991), a expectativa é que o custo de produção de clones seja reduzido pela automação ou pela produção de plântulas de suspensão de células via embriogênese somática e poliembriogênese. A longo prazo, produtos da embriogênese podem ser de uso para suplementar pomares de produção com genótipos altamente melhorados.

Há a necessidade de pesquisa para a obtenção de embriões somáticos de alta qualidade e em alta frequência.

Criopreservação e produção de sementes artificiais representam inovações recentes que podem ser úteis na tecnologia de pomares de sementes.

Transformação genética através de *Agrobacterium* e transferência direta de genes novos através da electroporação são agora técnicas possíveis de realização. Trabalhos complementares são necessários para o desenvolvimento de sistemas de genes úteis e transferíveis para regenerar, estabelecer e avaliar os produtos de transformação genética. Testes de campo serão necessários para a avaliação de árvores transgênicas para sua habilidade de adaptação às condições ambientais específicas encontradas nas florestas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Para a realização do experimento a espécie escolhida foi *Pinus taeda* L. (loblolly pine), comum no Estado da Georgia e de grande importância econômica e valor comercial no sul dos Estados Unidos, sendo considerada a segunda espécie mais importante para a produção de madeira do mundo.

No Brasil, *Pinus taeda* foi implantado e é cultivado com sucesso, sem limitações. Sua adaptação às condições ecológicas no sul do país é excelente, principalmente nos Estados do Paraná e de Santa Catarina, sendo utilizado em programas de reflorestamento de áreas devastadas (esgotamento de reservas florestais de *Araucaria angustifolia* Bert.). Em 1968 foram iniciados estudos de procedência de *Pinus taeda* no sul do país, intensificados pelo IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais) a partir de 1973, quando iniciou-se um programa intensivo de seleção de árvores superiores visando a produção de sementes melhoradas (BALENSIEFER, 1978; BARRICHELO et al., 1978; FONSECA et al., 1978; ARAUJO, 1980; ARAUJO, 1982.).

O Estado da Georgia apresenta 37% de todo "loblolly pine" dos Estados Unidos; o restante distribuído pelo sudeste do país, sendo 26% na Carolina do Sul; 22% na Carolina do Norte; 12% na Virginia; 3% na Flórida (BAKER & LANGDON, 1990).

3.1.1. Seleção

Sementes de quatro clones desta espécie foram selecionadas de acordo com as características de formato do tronco, produção de sementes, bom vigor e boa ramificação. Considerou-se também seus históricos em relação a performance dos clones em testes de progênie e em relação ao nível de infecção pelo fungo da ferrugem (*Cronartium fusiforme*).

Estes clones estão localizados num pomar de sementes da Comissão Florestal da Georgia (Georgia Forestry Commission), em Milledgeville, região centro-oeste da Georgia.

O solo é caracterizado como Norfolk; areno-argiloso, bem drenado, adequado às espécies de Pinus do sul dos E.U.A., com baixo risco de erosão, baixa limitação ao uso de equipamentos e baixa mortalidade de seedlings.. A declividade do terreno é de 1%, noroeste e o espaçamento entre árvores de aproximadamente 3.0 m por 3.0 m.¹

O clima da região caracteriza-se com temperaturas variando de 7.8°C a 15.6°C no inverno e de 22°C a 31.1°C no verão; chuvas em torno de 1270 mm/ano, distribuídas ao longo do ano, com pequena concentração nos meses de fevereiro a maio (primavera) e um período seco nos meses de julho a outubro (verão).²

¹ Serviço de Conservação do Solo (E.U.A). Comunicação pessoal, 1993.

² Comissão Florestal da Georgia. Comunicação pessoal, 1993.

3.1.2. Origem

Os clones foram identificados de acordo com sua origem:

Número de Série	Origem
520	Coweta County
558	Heard County
	—Nor-sudoeste da Georgia
590	Morgan County
615	Putnam County
	—Nor-sudeste da Georgia

O número de série representa o número de identificação do clone dentro do pomar de sementes e está associado com o condado (county) de onde este clone é originário, dentro do Estado da Georgia.

Dados complementares; datas de estabelecimento no pomar de sementes; altura aproximada; D.A.P. e outros são apresentados em APÊNDICE.

3.1.3. Coletas

Em julho de 1993 (verão, com temperatura média diária de 30°C), quando da maturação e fertilização dos óvulos (presença de semente com megagametófito maduro), deu-se início às coletas dos cones, dos clones selecionados, sendo em média

10 cones/clone, ao acaso, de diferentes partes da árvore, num total de 7 coletas, distribuídas da seguinte forma:

Coleta	Data
1º(A)	02.07.93
2º(B)	09.07.93
3º(C)	16.07.93
4º(D)	23.07.93
5º(E)	30.07.93
6º(F)	13.08.93
7º(G)	17.09.93

As coletas foram realizadas na parte da manhã, utilizando-se de um caminhão com braço elevador, com uma caçamba para duas pessoas na extremidade do braço, de propriedade da Comissão Florestal da Georgia.

Após coletados, os cones foram colocados em sacos de papel previamente identificados com data de coleta e número do clone, sendo então transportados em recipientes com gelo (coolers) e armazenados sob refrigeração no laboratório de cultura de tecidos da Escola de Recursos Florestais (School of Forest Resources), da Universidade da Georgia, em Athens/GA, onde foi iniciado o experimento em embriogênese somática.

3.2. Procedimento Laboratorial

3.2.1. Definição e preparo dos meios de cultura

Para a fase inicial do trabalho de pesquisa, cinco diferentes meios de cultura foram definidos como meios de iniciação, identificados da seguinte forma: M4; M5; M6; M7; M8 (Identificação, composição e referências sobre cada meio, ver APÊNDICE). A escolha dos meios utilizados no experimento foi feita com base na literatura existente sobre embriogênese somática, levando em consideração não só a literatura básica, como também trabalhos publicados com citações de experimentos envolvendo embriogênese somática em espécies correlatas (coníferas em geral).

Dados de TEASDALE et al. (1986) contribuíram para a escolha dos meios de cultura utilizados no experimento. Os autores determinaram as necessidades nutricionais de células de *Pinus taeda* através de medições quantitativas do crescimento de cultura de células. Como resultado, foi elaborado pelo autor um meio melhorado com boa resposta da cultura.

Outro trabalho de importância para a escolha dos meios de cultura, foi o de OWEN & MILLER (1991), onde a formulação de 14 meios basais foram examinadas a partir de suas citações originais. Imprecisões e erros foram encontrados para fórmulas moleculares, hidratações químicas e equivalências molares para o complexo Fe/EDTA. Uma comparação com formulações padrões de meios básicos publicada a partir de 6 fornecedores comerciais revelou imprecisões, modificações e erros adicionais. As correções efetuadas foram aplicadas aos meios utilizados no experimento, quando necessário. Informações adicionais foram obtidas pela análise do trabalho de MCCOWN & SELLMER (1987).

O preparo dos meios de cultura procedeu-se na sequência:

Componentes	Concentração
-Macronutrientes	10X
-Micronutrientes	1000X
-Fe - EDTA	100X
-Vitaminas	1000X
-Reg. de Crescimento	1 mg/ml

Cada solução foi preparada individualmente, sendo que cada sal foi pesado em balança analítica, adicionado em bequer contendo água bidestilada e dissolvido sob agitação magnética constante, até a obtenção de uma solução homogênea e uniforme. Em seguida foram colocados em frascos de vidro (500 ml), identificados e armazenados sob refrigeração. As vitaminas foram preparadas da mesma forma, mas em frascos menores (100 ml). Os reguladores de crescimento foram preparados na concentração de 1 mg/ml e adicionados a cada meio nas quantidades indicadas. Os suplementos orgânicos foram adicionados durante o preparo dos meios, nas quantidades indicadas.

Cada solução estoque foi adicionada na quantidade adequada para o volume de meio preparado, utilizando-se de pipetas graduadas (1;2;5;10 ml), em bequers com pequeno volume de água bidestilada, sob agitação magnética. Suplementos orgânicos (por exemplo, caseína hidrolisada, asparagina, glicina) foram adicionados na sequência de preparo, após pesagem em balança analítica. Reguladores de crescimento foram então acrescentados, com o uso de micropipetas. Por último foi adicionada a fonte

de açúcar (glicose, maltose ou sacarose) e, após sua dissolução sob agitação, o volume desejado foi completado com água bidestilada.

Em seguida, o pH foi ajustado, utilizando-se de peagâmetro eletrônico digital, sendo que o ajuste foi efetuado na faixa de 5.6 a 5.8, utilizando soluções de NaOH e/ou HCl em concentrações de 0,01 M e 0,1 M para ambas.

Como agentes solidificantes, foram utilizados Gel-Gro, um polímero natural, heteropolissacarídeo altamente purificado que forma géis em sistemas aquosos, sendo utilizado em lugar do agar, e Phytagar, um produto comercial que possui os constituintes e as características do agar, ambos adicionados na sequência do preparo, nas quantidades indicadas para cada meio.

Cada meio, em frasco de 1000 ml com tampa de papel alumínio, foi esterilizado por autoclavagem a 121°C sob pressão de 1.1 kg/cm², por 20 minutos.

Após autoclavagem, os meios foram distribuídos em placas de Petri de poliestireno, descartáveis, pré-esterilizadas por irradiação gama, de dimensões 60 x 15 mm, sob câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada com etanol 70%. Cada placa foi então identificada de acordo com o meio (M4; M5; M6; M7; M8).

Meios contendo glutamina em sua composição tiveram esta adicionada após autoclavagem, via filtro-esterilização, por meio de filtros esterilizados de celulose (25 mm) descartáveis e seringas plásticas esterilizadas descartáveis (5 cc; 10 cc; 20 cc).

3.2.2. Preparo, esterilização e inoculação dos explantes

Todo trabalho de inoculação foi realizado em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada com etanol 70%. Os instrumentos utilizados no processo foram esterilizados com etanol 95%, sendo imediatamente flambados em chama de gás.

No preparo dos explantes foram consideradas algumas etapas que incluem esterilização superficial dos cones, remoção das sementes, esterilização das sementes, abertura das sementes e remoção do megagametófito.

O protocolo para esterilização é descrito na sequência:

1. Esterilização superficial dos cones/ remoção de resina em superfície.
- etanol 70% por 30 segundos
2. Abertura do cone por meio de tesoura e bisturi cirúrgicos.
3. Retirada das sementes dos cones por meio de pinças.
4. Esterilização das sementes:

As sementes foram colocadas, em pequenas quantidades, em sacos de tecido semelhante à gase (cheesecloth) que foi mergulhado nas seguintes soluções na sequência:

- a. etanol 70% - 30 segundos - esterilização superficial e remoção de alguma resina presente.
- b. solução detergente (Rocal II) 10% à base de alquil, dimetil benzil amônio cloreto, álcool etil e água - 30 segundos - esterilização superficial (agente germicida e algicida).

- c. solução de hipoclorito de sódio (Clorox) 15% - 5 minutos - principal agente esterilizante (germicida).
- d. água esterilizada - 30 segundos - primeira lavagem
- e. ácido clorídrico 0.01 N - 30 segundos - segunda lavagem e remoção dos excessos de detergente e hipoclorito.
- f. água esterilizada - 30 segundos - lavagem final.

Após a última lavagem e drenagem do excesso de água, as sementes foram transferidas para placas de Petri de vidro esterilizadas por autoclavagem, contendo em sua base papel de filtro umedecido com água esterilizada, para evitar o ressecamento das sementes durante o processo de inoculação.

A abertura das sementes foi procedida por meio de tesoura cirúrgica, realizando-se uma pequena incisão na parte mediana da semente, transversalmente, de modo a romper o tegumento, sem causar danos ao embrião, contido no interior do megagametófito.

Os embriões, com cerca de 0,5 cm de comprimento por 0,2 cm de espessura, foram removidos por meio de pinças cirúrgicas e inoculados em meios de cultura, em placas de Petri, na sequência:

Embrião 1 - meio M4 - placa 1

Embrião 2 - meio M4 - placa 2

Embrião 3 - meio M4 - placa 3

: : :

Embrião 10 - meio M4 - placa 10

Embrião 11 - meio M4 - placa 1

Embrião 12 - meio M4 - placa 2

: : :

Embrião 48 - meio M4 - placa 8

Embrião 50 - meio M4 - placa 10

Desta forma, para cada meio, utilizaram-se 10 placas de Petri, sendo que em cada placa foram colocados 5 embriões. Por exemplo, o embrião número 1 foi colocado na primeira placa do meio 4; o número 2 na segunda placa de M4; e assim por diante, até que a última placa (10) recebesse o embrião 10. A partir deste ponto retornou-se à placa 1 onde foi colocado o embrião 11; em seguida à placa 2, com o embrião 12, e assim por diante, até que fossem completados 5 embriões para cada placa, em 10 placas, para cada meio, nos 5 meios de iniciação. Este procedimento foi repetido para cada época de coleta, para cada clone.

O delineamento experimental planejado pode ser descrito da seguinte forma: 4 clones; 7 épocas de coleta; 5 meios de cultura; 10 placas para cada meio (repetições); 5 embriões por placa. Num balanço final, cerca de 7000 embriões seriam inoculados em cultura (figuras 5, 6, 7 e 8).

Ao término de cada inoculação, as placas foram seladas em sua lateral com um filme plástico adesivo (Parafilm). Em seguida, cada placa foi identificada como se segue:

* exemplo:

- 590-B, onde 590 é o número do clone e B indica ser a segunda coleta realizada.
- 19.07.93 - data da inoculação.
- M5 - meio utilizado.
- 1241 - número de identificação da placa.

A figuras 3 e 4 mostram respectivamente um esquema da disposição dos embriões em placas de Petri e a identificação das mesmas.

Disposição dos embriões em placas de Petri e identificação das placas - Inoculação

Figura 3. Esquema da disposição dos embriões.

Figura 4. Esquema da identificação das placas (exemplo).

Delineamento Experimental

		<i>CLONE</i>			
		<i>520</i>	<i>558</i>	<i>590</i>	<i>615</i>
C O L E T A	A	50	50	50	50
	B	50	50	50	50
	C	50	50	50	50
	D	50	50	50	50
	E	50	50	50	50
	F	50	50	50	50
	G	50	50	50	50

Figura 5. Número de placas/clone/coleta.

		<i>CLONE</i>			
		<i>520</i>	<i>558</i>	<i>590</i>	<i>615</i>
C O L E T A	A	250	250	250	250
	B	250	250	250	250
	C	250	250	250	250
	D	250	250	250	250
	E	250	250	250	250
	F	250	250	250	250
	G	250	250	250	250

Figura 6. Número de sementes/clone/coleta.

Delineamento Experimental

		MEIO DE CULTURA				
		M4	M5	M6	M7	M8
C O L E T A	A	10	10	10	10	10
	B	10	10	10	10	10
	C	10	10	10	10	10
	D	10	10	10	10	10
	E	10	10	10	10	10
	F	10	10	10	10	10
	G	10	10	10	10	10

Figura 7. Número de placas/meio/coleta, para cada clone.

		MEIO DE CULTURA				
		M4	M5	M6	M7	M8
C O L E T A	A	50	50	50	50	50
	B	50	50	50	50	50
	C	50	50	50	50	50
	D	50	50	50	50	50
	E	50	50	50	50	50
	F	50	50	50	50	50
	G	50	50	50	50	10

Figura 8. Número de sementes/meio/coleta, para cada clone.

Os dados referentes às inoculações foram anotados em diário de laboratório, obedecendo ao seguinte esquema:

LLP 1241 A 19.07.93 M5 D 590-B 09.07.93

LLP 1241 B 19.07.93 M5 D 590-B 09.07.93

: : : : : : :

(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)

onde:

- (1) identificação da espécie - LLP - Loblolly pine.
- (2) número de identificação da placa.
- (3) identificação do embrião.
- (4) data da inoculação.
- (5) meio utilizado.
- (6) condição da cultura - D(dark) - escuro; L(light) - luz.
- (7) identificação do clone (590) e coleta(B; segunda).
- (8) data da coleta.

Ao final de cada folha do diário foi reservado um espaço para observações referentes às avaliações de crescimento/desenvolvimento e contaminações.

3.2.3. Condições ambientais de cultivo

As culturas foram mantidas em condições de ausência de luz; para isto foram colocadas em caixas de papelão devidamente fechadas. As caixas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada à $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

Cada cultura foi examinada periodicamente, cerca de 2 a 3 vezes por semana, com avaliações de crescimento e/ou desenvolvimento e níveis de contaminação por bactérias e/ou fungos. A identificação dos agentes contaminantes não foi realizada, uma vez que não constava dos objetivos do trabalho.

Apesar do delineamento experimental planejado ter sido traçado com antecedência, não foi possível segui-lo, uma vez que houve problemas de ordem material, como número insuficiente de sementes em um cone, devido à alta taxa de contaminação interna do cone, resultando num número pequeno de sementes formadas. Também em alguns casos, utilizou-se um número de placas maior do que o planejado no delineamento experimental, em função do aproveitamento das sementes disponíveis. Neste contexto, as tabelas abaixo representam o delineamento experimental corrigido (figuras 9, 10, 11 e 12).

Delineamento Experimental

		CLONE			
		520	558	590	615
C O L E T A	A	45	50	44	50
	B	61	49	42	50
	C	65	50	44	51
	D	82	50	57	50
	E	48	50	50	50
	F	50	50	40	50
	G	50	50	37	20

Figura 9. Número de placas/clone/coleta

		CLONE			
		520	558	590	615
C O L E T A	A	225	250	220	250
	B	305	245	210	250
	C	325	250	220	255
	D	410	250	285	250
	E	240	250	250	250
	F	250	250	200	250
	G	250	250	185	100

Figura 10. Número de sementes/clone/coleta.

Delineamento Experimental

		MEIO DE CULTURA				
		M4	M5	M6	M7	M8
C O L E T A	A	9	9	9	9	9
	B	10	10	10	10	10
	C	10	10	10	10	10
	D	12	12	12	12	12
	E	10	10	10	10	10
	F	9	9	9	9	9
	G	8	8	8	8	8

Figura 11. Número de placas/meio/coleta, para cada clone (média).

		MEIO DE CULTURA				
		M4	M5	M6	M7	M8
C O L E T A	A	45	45	45	45	45
	B	50	50	50	50	50
	C	50	50	50	50	50
	D	60	60	60	60	60
	E	50	50	50	50	50
	F	45	45	45	45	45
	G	40	40	40	40	40

Figura 12. Número de sementes/meio/coleta, para cada clone (média).

São portanto: 4 clones, 7 épocas de coleta, 5 meios de cultura, porém o número de placas foi variável para cada clone e para cada meio (figuras 9 e 11), resultando em 1385 placas com 5 embriões em cada uma, num total de 6925 embriões estabelecidos em cultura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme citação anterior, dois tipos básicos de avaliação foram realizados; contaminação e crescimento e/ou desenvolvimento.

4.1. Contaminação

A determinação das culturas que apresentaram alguma forma de contaminação foi efetuada através da análise visual das placas de Petri.

Os níveis de contaminação para cada clone, em termos de número de placas contaminadas e percentagem de placas contaminadas em relação ao número de placas estabelecidas, para cada época de coleta, são apresentados nas figuras 13 e 14, respectivamente.

Embora as avaliações de contaminação tenham sido efetuadas semanalmente, os quadros apresentam a avaliação para o período total do experimento, realizada em 20/01/94.

		CLONE			
		520	558	590	615
C O L E T A	A	5	2	0	8
	B	1	5	7	1
	C	2	5	0	1
	D	24	0	13	0
	E	2	3	1	5
	F	2	7	0	36
	G	28	32	14	1

Figura 13. Contaminação total (número de placas em 20.01.94).

		CLONE			
		520	558	590	615
C O L E T A	A	11	4	0	16
	B	2	10	17	2
	C	3	10	0	2
	D	29	0	23	0
	E	4	6	2	10
	F	4	14	0	72
	G	56	64	38	70

Figura 14. Contaminação total (percentagem de placas em 20.01.94).

4.1.1. Efeito I - época de coleta

As culturas para as épocas de coleta F e G foram descartadas para efeito de avaliações para crescimento, devido aos altos níveis de contaminação; 22.5% e 57% em média, respectivamente.

As culturas para as épocas de coleta C e E apresentaram o menor número de contaminações; 8 e 11 placas, cerca de 3,8% e 5,5%, respectivamente, em média para cada clone (figuras 13 e 14).

4.1.2. Efeito II - clone

Os clones 590 e 558 apresentaram o menor número de contaminações; 35 e 54 placas, cerca de 11,3% e 15,5%, respectivamente, em média para cada época de coleta (Figuras 13 e 14).

O clone 615 apresentou maior percentual de contaminações, 24,6% em média, com 52 placas contaminadas. Em seguida vem o clone 520, 15,6% em média, com 64 placas contaminadas (Tabelas 13 e 14).

4.1.3. Efeito III - meio de cultura

Não foi realizada nenhuma análise do efeito do meio de cultura sobre os níveis de contaminação.

4.1.4. Interação I - clone X época de coleta

Avaliando-se a interação entre clone e época de coleta sobre os níveis de contaminação, descartando-se as duas últimas épocas de coleta (F e G), observou-se que os melhores resultados foram para as interações:

- Clone 590 X Época A;
- Clone 590 X Época C;

- Clone 558 X Época D;
- Clone 615 X Época D.

Para todas as interações acima os níveis de contaminação foram zero. Os menores níveis de contaminação foram para as seguintes interações:

- Clone 558 X Época A (4%);
- Clone 615 X Época B (2%);
- Clone 615 X Época C (2%);
- Clone 590 X Época E (2%).

Os maiores níveis de contaminação foram para as seguintes interações:

- Clone 590 X Época B (17%);
- Clone 558 X Época C (10%);
- Clone 520 X Época D (29%);
- Clone 615 X Época E (10%).

Considerando as interações apresentadas, a época de coleta pode ser um fator determinante no nível de contaminação, devendo haver alguma relação entre o estágio de desenvolvimento do explante e sua susceptibilidade à contaminação, pois em determinados casos os níveis foram zero para determinadas interações entre clone e época de coleta.

Foi possível detectar que a maior parte da contaminação existente, não foi de origem do próprio explante (o embrião, no caso), uma vez que pontos de contaminantes (fungos ou bactérias) surgiram em áreas isoladas sobre o meio de cultura, distante do explante. A exceção faz-se para as duas últimas épocas de coleta, F e G, cujo nível de contaminação foi alto, sendo observado já na abertura dos cones a presença de

contaminação no interior dos mesmos. Estas observações levam à hipótese de contaminação por manuseio do material ou mesmo pela existência de agentes contaminantes no próprio ambiente de trabalho, particularmente no caso de bactérias.

Para um total de 1385 placas de cultura estabelecidas, temos um total de 205 placas com contaminação presente, representando 14,8% de culturas contaminadas.

4.2. Crescimento e/ou desenvolvimento (indução)

A determinação de algum crescimento e/ou desenvolvimento presente nas culturas estabelecidas foi realizada através da análise visual das placas de Petri, onde foram verificadas alterações estruturais nos embriões inoculados. O crescimento e/ou desenvolvimento na verdade consiste na indução de calos, os quais foram observados quanto às suas características para formação de tecido embriogênico.

As figuras 15 e 16 apresentam respectivamente o número e o percentual de placas com indução de calos, para cada clone, em cada época de coleta. O percentual foi determinado em função do número de placas estabelecidas. As avaliações cobrem o período de julho a novembro de 1993.

Foram também analisados os efeitos do clone, da época de coleta, do meio de cultura individualmente sobre os percentuais de indução de calos, assim como das interações entre eles.

		CLONE			
		520	558	590	615
C O L E T A	A	27	47	21	43
	B	32	38	22	39
	C	44	37	31	41
	D	40	38	36	39
	E	34	17	23	31
	F	0	30	0	0
	G	0	0	0	0

Figura 15. Número de culturas em crescimento (julho a novembro/93).

		CLONE			
		520	558	590	615
C O L E T A	A	60	94	48	52
	B	52	77	52	78
	C	68	74	70	80
	D	49	76	63	78
	E	71	34	46	62
	F	D	D	D	D
	G	D	D	D	D

Figura 16. Percentagem de placas com crescimento

Obs.: D - descartado.

4.2.1. Efeito I - época de coleta

Em análise efetuada sobre o efeito da época de coleta sobre a percentagem de indução de calos, observou-se que os melhores resultados foram para as épocas de coleta C e A, com 153 e 138 placas respectivamente. As médias percentuais foram de 73% para ambas as épocas. Outras que apresentaram bons resultados foram as épocas B e D, com 65% (32 placas em média) e 64% (38 placas em média) respectivamente (Figuras 15 e 16).

Esses resultados demonstram a importância da época de coleta do explante, de acordo com BECWAR et al. (1988) e ROBERTS et al. (1989), que afirmam haver um período de desenvolvimento cuja resposta à formação de tecido embriogênico é maior.

4.2.2. Efeito II - clone

Os clones que apresentaram maiores percentuais de indução de calos foram os clones 615, com 193 placas, média de 77%, e 558, com 177 placas, média de 71%. Os demais clones apresentaram também bons resultados, apesar de estarem abaixo dos níveis atingidos pelos clones 558 e 615, ficando em torno de 60% para o clone 520 e 56% para o clone 590 (Figuras 15 e 16).

Os resultados confirmam a importância do fator genótipo, pois diferentes genótipos dentro de uma mesma espécie apresentam diferentes respostas quanto à formação de tecido embriogênico (TAUTORUS et al., 1991).

4.2.3. Efeito III - meio de cultura

Em análise do efeito dos meios de cultura sobre o percentual de indução de calos, observou-se que os meios M6, M5 e M7 apresentaram as melhores respostas, na ordem de 82%, 82% e 75% respectivamente (Figuras 17, 18, 19, 20 e 21).

Diferenças nos percentuais de indução em relação aos meios utilizados poderiam ser justificadas com base na diferente composição dos meios. Entretanto, mesmo em comparação com os meios que apresentaram altos percentuais de indução (M6, M5 e M7), observa-se que há diferenças notáveis na composição de cada um deles. Desta forma não é correto concluir que os altos níveis de indução são devido às quantidades maiores ou menores de um determinado componente, seja ele um sal orgânico, um componente inorgânico ou mesmo um regulador de crescimento. É mais provável que um efeito conjunto do meio com outros fatores sejam responsáveis pelas diferenças apresentadas, não o meio por si só. Esses fatores podem ser o clone, a época de coleta ou ambos interagindo.

TAUTORUS et al. (1991) afirma que diferentes genótipos apresentam diferentes requerimentos nutricionais para a produção de tecido embriogênico. Além disso, YI (1989) aponta que a escolha do meio é arbitrária, uma vez que as interações explante-nutrientes não foram ainda devidamente definidas.

		MEIO DE CULTURA				
		M4	M5	M6	M7	M8
C O L E T A	A	5	5	3	7	7
	B	9	11	11	2	2
	C	4	11	10	12	7
	D	4	12	12	8	4
	E	5	9	9	7	4
	F	D	D	D	D	D
	G	D	D	D	D	D

Figura 17. Número de placas/meio/coleta, para o clone 520.

Obs.: D - descartado.

		MEIO DE CULTURA				
		M4	M5	M6	M7	M8
C O L E T A	A	9	10	10	11	7
	B	9	7	10	8	3
	C	10	4	9	10	4
	D	5	9	10	10	8
	E	0	3	1	11	2
	F	D	D	D	D	D
	G	D	D	D	D	D

Figura 18. Número de placas/meio/coleta, para o clone 558.

Obs.: D - descartado.

		MEIO DE CULTURA				
		M4	M5	M6	M7	M8
C O L E T A	A	3	6	5	1	6
	B	4	7	6	3	1
	C	7	6	8	8	2
	D	5	7	6	11	6
	E	0	5	9	8	1
	F	D	D	D	D	D
	G	D	D	D	D	D

Figura 19. Número de placas/meio/coleta, para o clone 590.

Obs.: D - descartado.

		MEIO DE CULTURA				
		M4	M5	M6	M7	M8
C O L E T A	A	7	6	11	10	9
	B	9	8	9	10	2
	C	7	10	10	10	7
	D	3	10	9	10	4
	E	0	7	10	10	4
	F	D	D	D	D	D
	G	D	D	D	D	D

Figura 20. Número de placas/meio/coleta, para o clone 615.

Obs.: D - descartado.

		MEIO DE CULTURA				
		M4	M5	M6	M7	M8
C O L E T A	A	24	27	29	29	29
	B	31	33	36	23	8
	C	28	31	37	40	20
	D	17	38	37	39	22
	E	5	24	29	36	11
	F	D	D	D	D	D
	G	D	D	D	D	D

Figura 21. Número de placas com crescimento/meio/coleta, para os 4 clones.

Obs.: D - descartado.

Considerando-se os efeitos do clone, da época de coleta e do meio de cultura na taxa de indução de calos e o provável efeito da interação entre eles, foram analisadas as interações para clone X época de coleta; clone X meio de cultura; meio de cultura X época de coleta e clone X época de coleta X meio de cultura.

4.2.4. Interação I - clone X época de coleta

Os melhores resultados são apresentados para a interação clone 558 X época A, cujo percentual de indução foi na ordem de 94%.

Outras interações que apresentaram boas respostas de indução foram as seguintes: clone 615 X época C (80%); clone 558 X época B, clone 558 X época D e clone 615 X época B (cada um com 76%); clone 615 X época A (52%).

Essa análise foi realizada a partir dos dados apresentados nas figuras 15 e

16.

4.2.5. Interação II - clone X meio de cultura

As interações que apresentaram os melhores resultados foram clone 615 X meio M7 e clone 558 X meio M7, ambos com percentuais de indução na ordem de 71% cada. Resultados semelhantes foram obtidas para as interações clone 615 X meio M6, clone 615 X meio M5 e clone 558 X meio M6, com 69%, 58% e 57% respectivamente.

As interações foram determinadas com base nos dados apresentados nas figuras 22 e 23.

		CLONE			
		520	558	590	615
C O L E TA	M4	63	70	62	70
	M5	85	69	59	70
	M6	91	70	62	71
	M7	115	70	80	70
	M8	67	70	70	70

Figura 22. Número total de placas estabelecidas/meio/clone

		CLONE			
		520	558	590	615
C	M4	27	33	19	26
O	M5	48	33	31	41
L	M6	45	40	34	49
E	M7	36	50	31	50
TA	M8	24	24	16	26

Figura 23. Número de placas com crescimento/clone/ meio.

4.2.6. Interação III - meio de cultura X época de coleta

Os melhores percentuais de indução foram para as interações meio M7 X época C e meio M6 X época C, com 100% e 92% respectivamente, seguidos das interações meio M6 X época B e meio M7 X época E, ambas com 90% (Figuras 21 e 24).

		MEIO DE CULTURA				
		M4	M5	M6	M7	M8
C O L E T A	A	38	38	38	38	38
	B	40	40	40	40	40
	C	42	42	42	42	42
	D	48	48	48	48	48
	E	40	40	40	40	40
	F	D	D	D	D	D
	G	D	D	D	D	D

Figura 24. Número de placas/meio/época (média).

4.2.7. Interação IV - clone X época de coleta X meio de cultura

Para a análise da interação entre clone, época de coleta e meio de cultura no percentual de indução de calos, foi considerada cada interação separadamente, com seus melhores resultados, como se segue:

- Clone X Época:

558 X A 615 X C 615 X A

558 X B 558 X D 615 X B

- Clone X Meio:

615 X M7 558 X M7

615 X M6 558 X M6

- Meio X Época:

M6 X C M6 X B

M7 X C M7 X E

Observa-se portanto que os melhores resultados podem ser expressos pela combinação das interações duas a duas, obtendo como melhores interações:

- Clone 615 X Época de coleta C X meio M6;
- Clone 615 X Época de coleta C X meio M7;
- Clone 615 X Época de coleta B X meio M6;
- Clone 558 X Época de coleta B X meio M6.

A análise das interações foi realizada com base nos dados apresentados nos quadros utilizados para a análise individual de cada interação.

Para um total de 1385 culturas (placas de Petri) estabelecidas, obtivemos 507 culturas com calos induzidos, representando uma frequência de indução da ordem de 36,6%.

Os calos apresentam características embriogênicas; coloração branca, translúcidos, textura muscilaginosa, brilhantes (JAIN et al., 1989).

5. CONCLUSÕES

A indução de calos ocorreu a partir da 6ª semana do estabelecimento das culturas e continuou por cerca de 4 meses, observando-se indução de calos até o mês de novembro de 1993.

Houve efeito do clone sobre a percentagem de indução de calos, sendo os clones 615 e 558 os que apresentaram melhores respostas. Este efeito pode ser o efeito do genótipo.

Houve efeito do meio de cultura sobre a percentagem de indução de calos, sendo os meios M6 e M5 os que apresentaram melhores respostas. Entretanto, cabe ressaltar que esse efeito pode estar mascarado pelas interações meio de cultura X clone X época de coleta dos explantes.

Houve efeito da época de coleta dos explantes na percentagem de indução de calos, indicando que o estágio de desenvolvimento do explante é fator importante para o estabelecimento de culturas e a indução de calos.

A interação clone X meio de cultura afeta a percentagem de indução de calos, indicando que diferentes clones apresentam diferentes requerimentos nutricionais.

A interação clone X época de coleta dos explantes afeta a percentagem de indução de calos, indicando que, para diferentes clones, há diferentes épocas de coleta adequadas para a indução de calos.

A interação meio de cultura X época de coleta dos explantes afeta a percentagem de indução de calos, indicando que, para diferentes épocas de coleta, há diferentes requerimentos nutricionais pelos explantes.

A interação clone X meio de cultura e X época de coleta dos explantes afeta a percentagem de indução de calos. Para um determinado clone, há uma época de coleta que resultará em melhor resposta quanto à indução de calos num determinado meio de cultura.

Os calos induzidos são calos embriogênicos, uma vez que apresentam características idênticas às descritas em literatura para tecidos embriogênicos.

A frequência de indução de calos foi relativamente alta, cerca de 36,6%, quando comparada àquelas citadas pela literatura (5 a 10%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, M. R. In vitro propagation of Poplar and Aspen. In: BONGA, J.M.& DURZAN, D. J., ed. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987. v.3: Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms, p.207-23. (Forestry Sciences).
- ALMEIDA, C. V. Avaliação do comportamento morfogênético de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* BARR. & GOLF. "in vitro". Piracicaba, 1991. 74p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- AMERSON, H. V.; FRAMPTON, L. J.; MOTT, R. L.; SPAINE, P. C. Tissue culture of conifers using loblolly pine as a model. In: HANOVER, J. S. & KEATHLEY, D. F., ed. **Genetic manipulation of woody plants**. New York, Plenum Press, 1988, p.117-37.
- ARAUJO, A. J. Early results of provenance studies of loblolly and slash pine in Brazil. Michigan, 1980. (Doutorado - Michigan State University).
- ARAUJO, A. J. Introdução de espécies e procedências de *Pinus*. In: REUNIÃO DO GRUPO PERMANENTE DE TRABALHO EM MELHORAMENTO GENÉTICO FLORESTAL, 6., Belo Horizonte, 1982.
- ATTREE, S. M. & FOWKE, L. C. Micropropagation through somatic embryogenesis in conifers. In: BAJAJ, Y. P. S., ed. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin, Springer-Verlag, 1991. v.17: High-tech and micropropagation, p. 53-70.
- ATTREE, S. M. & FOWKE, L. C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **35**: 1-35, 1993.

- ATTREE, S. M.; DUNSTAN, D. I.; FOWKE, L. C. White spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] and black spruce [*Picea mariana* (Mill) B.S.P.]. In: BAJAJ, Y. P. S., ed. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin, Springer-Verlag, 1991. v.16: Trees III, p. 423-45.
- BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin, Springer-Verlag, 1986. v.1: Trees I, 608p.
- BAKER, J. B. & LANGDON, O. G. *Pinus taeda* L. - Loblolly Pine. In: BURNS, R. M. & HONKALA, B. H., ed. **Silvics of north america**. Washington, USDA Forest Service, 1990. v.1: Conifers, p. 497-512 (Agriculture Handbook).
- BALENSIEFER, M. Estudos de diferentes métodos de plantio com *Pinus taeda* na região de Guarapuava - Paraná. Curitiba, 1978. (Mestrado- Universidade Federal do Paraná).
- BARRICHELO, L. E.; KAGEYAMA, P. Y.; SPELTZ, R. M.; BONISH, H. J.; BRITO, J. O.; FERREIRA, M. Estudos de procedência de *Pinus taeda* visando seu aproveitamento industrial. **Boletim Informativo - IPEF**, Piracicaba, 6(18): 1-14, 1978.
- BECWAR, M. R.; NAGMANI, R.; WANN, S. R. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, 20: 810-7, 1990.
- BECWAR, M. R.; WANN, S. R.; JOHNSON, M. A.; VERHAGEN, S. A.; FEIRER, R. P.; NAGMANI, R. Development and characterization of in vitro embryogenic systems in conifers. In: AHUJA, M. R., ed. **Somatic cell genetics of woody plants**, Dordrecht, Kluwer Academic, 1988. p. 1-18.

- BERCETCHE, J. Optimization des conditions d'obtention de plantules a partir de cals embryogènes chez *Picea abies*. **Annales de Recherche Sylvicoles**, Paris, (1988): 97-115, 1989.
- BHOJWANI, S. S. & RAZDAN, M. K. Micropropagation of woody species. In: _____, ed. **Plant tissue culture: theory and practice**. New York, Elsevier Science, 1986. v.5, p. 313-7. (Forestry Sciences).
- BONGA, J. M. Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. In: BONGA, J. M. & DURZAN, D. J., ed. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987a. v.1.: General principles and biotechnology. p. 249-71. (Forestry Sciences).
- BONGA, J. M. Tree tissue culture applications. In: MARAMOROSCH, K., ed. **Advances in cell culture**. New York, Academic Press, 1987b. v.5, p. 209-39.
- BONGA, J. M. & ADERKAS, P. V. **In vitro culture of trees**. Dordrecht, Kluwer Academic, 1992. 236 p. (Forestry Sciences, 38).
- BORNMAN, C. H. Maturation of somatic embryos. In: REDENBAUGH, K., ed. **Synseeds; applications of synthetic seeds to crop improvement**. Boca Raton, CRC Press, 1993. cap. 6, p. 105-13.
- BROWN, C. L. & LAWRENCE, R. H. Culture of pine callus on a defined medium. **Forest Science**, Washington, 14: 62-4, 1968.
- BUIJTENEN, J. P. van & SHAW, D. Vegetative propagation of loblolly pine. In: INTERNATIONAL IUFRV SYMPOSIUM ON NURSERY MANAGEMENT OF SOUTHERN PINES, Auburn, 1985. **Proceedings**. Auburn, 1985. p. 10-1.

- BUIJTENEN, J. P. van; TOLIVER, J.; BOWER, R.; WENDAL, M. Mass production of loblolly pine and slash pine cuttings. **Tree Planters' Note**, Washington, 26: 4-6, 1975.
- CALDAS, L. S. & TORRES, A. C. Histórico da cultura de tecidos de plantas. In: _____, ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP, 1990. p.15-9.
- CAMERON, R. J. & THOMSON, G. V. The vegetative propagation of *Pinus radiata*: root initiation in cuttings. **Botanical Gazette**, Chicago, 130(4): 242-51, 1969.
- CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y.; BI, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, Beijing, 18: 659-68, 1975.
- DALLIMORE, W. & JACKSON, A. B. **A handbook of Coniferae and Ginkgoaceae**. 5 ed. London, Edward Arnold, 1974. 729p.
- DORMAN, K. W. Vegetative propagation. In: _____, ed. **The genetics and breeding of southern pines**. Washington, USDA, 1976. p. 65-85. (Agriculture Handbook, 471).
- DURZAN, D. J. Progress and promise in forest genetics. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INSTITUTE OF PAPER AND CHEMISTRY, 50. Appleton, 1978. Paper science and technology, the cutting edge; proceedings. Appleton, I.P.C., 1980. p. 31-60.
- DURZAN, D. J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: FRANS KEMPE SYMPOSIUM. Umea, 1988. Molecular genetics of forest trees, edited by J. E. HALLGREN. Swedish Agriculture University, Umea, 1988a. p.147-86.

- DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology Genetics Engineering Review**, Andover, 6: 339-76, 1988b.
- DURZAN, D. J. & CAMPBELL, R. A. Prospect for the mass production of improved stock of forest trees by cell and tissue culture. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, 4: 151-74, 1974.
- DURZAN, D. J. & GUPTA, P. K. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. **Plant Science**, Limerick, 52: 229-35, 1987.
- FERRARI, M. P. Clonagem em *Pinus*; uma visão empresarial. In: SEMINÁRIO DE BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA, 4., Piracicaba, 1986. **Anais**. Piracicaba, FEALQ, 1986. p. 30-41.
- FONSECA, S. M.; KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA, M.; JACOB, W. S. Programa conjunto de melhoramento genético e produção de sementes de *Pinus taeda* na região sul do Brasil. **Boletim Informativo - IPEF**, Piracicaba, 6(18): 61-73, 1978.
- FOSTER, A. S. & GIFFORD JR., E. M. The Coniferopsida: Coniferales. In: _____, ed. **Comparative morphology of vascular plants**. San Francisco, W. H. Freeman, 1974. cap. 17, p.465-518.
- FRAMPTON JR., L. J. & JETT, J. B. Juvenile wood specific gravity of loblolly pine tissue culture plantlets and seedlings. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, 19: 1347-50, 1989.
- GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: CALDAS, L. S. & TORRES, A. C., ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP, 1990. p. 19-28.

- GONÇALVES, A. N. Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake "in vitro". Piracicaba, 1982. 98p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: CALDAS, L. S. & TORRES, A. C., ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP, 1990. p. 99-170.
- GREENWOOD, M. S. Effect of age on vegetative growth characteristics by asexual propagules of loblolly pine. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 16., Blacksburg, 1981. **Proceedings**. Blacksburg, 1981. p. 16-8.
- GUPTA, P. K. & DURZAN, D. J. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis from subcultured callus of mature embryos of *Picea abies*(Norway spruce). In **Vitro Cellular Development Biology**, Rockville, 22: 685-8, 1986a.
- GUPTA, P. K. & DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis from callus of mature embryos of sugar pine. **BIO/TECHNOLOGY**, New York, 4: 643-5, 1986b.
- GUPTA, P. K. & DURZAN, D. J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. **BIO/TECHNOLOGY**, New York, 5(2): 147-51, 1987a.
- GUPTA, P. K. & DURZAN, D. J. Somatic embryos from protoplasts of loblolly proembryonal cells. **BIO/TECHNOLOGY**, New York, 5: 710-2, 1987b.
- GUPTA, P. K. & DURZAN, D. J. Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). In: BAJAJ, Y. P. S., ed. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin, Springer-Verlag, 1991. v.16: Trees III, p. 383-407.

GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J.; FINKLE, B. J. Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, **17**: 1130-4, 1987a.

GUPTA, P. K.; SHAW, D.; DURZAN, D. J. Loblolly pine; micropropagation, somatic embryogenesis and encapsulation. In: BONGA, J. M. & DURZAN, D. J., ed. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987b. v.3: Case histories: gymnosperms, angiosperms and palms, p. 101-8. (Forestry Sciences).

GUPTA, P. K.; PULLMAN, G.; TIMMIS, R.; KREITINGER, M.; CARLSON, W. C.; GROB, J.; WELTY, E. Forestry in the 21st century; the biotechnology of somatic embryogenesis. **BIO/TECHNOLOGY**, New York, **11**: 454-9, 1993.

HALL, K. Biology and genetics; Introduction. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INSTITUTE OF PAPER AND CHEMISTRY, 50. Appleton, 1978. Paper science and technology, the cutting edge; proceedings. Appleton, I.P.C., 1980. p. 15-17.

HAKMAN, I. & FOWKE, L. C. Somatic embryogenesis in *Picea glauca* (white spruce) and *Picea mariana* (black spruce). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **65**: 656-9, 1987.

HARLOW, W. M. & HARRAR, E. S. **Textbook of dendrology**. 3 ed. New York, McGraw-Hill, 1950. 555p.

HARTMANN, H. T. & KESTER, D. E. Anatomical and physiological basis of propagation by cuttings. In: _____, ed. **Plant propagation; principles and practices**. New Jersey, Prentice Hall, 1991a. p. 253- 97.

- HARTMANN, H. T. & KESTER, D. E. Layering and its natural modifications. In: _____, ed. **Plant propagation; principles and practices**. New Jersey, Prentice Hall, 1991b. p. 472-90.
- HARTMANN, H. T. & KESTER, D. E. Techniques of propagation by cuttings. In: _____, ed. **Plant propagation; principles and practices**. New Jersey, Prentice Hall, 1991c. p. 298-342.
- HARTMANN, H. T. & KESTER, D. E. Theoretical aspects of grafting and budding. In: _____, ed. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey, Prentice Hall, 1991d. p. 343-98.
- JAIN, S. M.; DONG, N.; NEWTON, R. J. Somatic embryogenesis in slash pine(*Pinus elliottii*) from immature embryos cultured "in vitro". **Plant Science**, Limerick, **65**: 233-41, 1989.
- JONES, N. B.; STADEN, J. V.; BAYLEY, A. D. Somatic embryogenesis in *Pinus patula*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, **142**: 366-72, 1993.
- KLIMASZEWSKA, K. Plantlet development from immature zygotic embryos of hibrid Larch through somatic embryogenesis. **Plant Science**, Limerick, **63**: 95-103, 1989.
- KROGSTRUP, P.; ERIKSEN, E. N.; MOLLER, J. D.; ROULUND, H. Somatic embryogenesis in sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). **Plant Cell Reports**, New York, **7**: 594-7, 1988.
- KUHLMAN, E. G. Disease in stand management of loblolly pine. In: SYMPOSIUM OF LOBLOLLY PINE ECOSYSTEM (EAST REGION), Raleigh, 1982. **Proceedings**. Raleigh, 1982. p. 188-97.

- LAINE, E. & DAVID, A. Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus caribaea*. **Plant Science**, Limerick, **69**: 215-24, 1990.
- MCCOWN, B. H. & SELLMER, J. C. General media and vessels suitable for woody plant culture. In: BONGA, J. M. & DURZAN, D. J., ed. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987. v.1: general principles and biotechnology, p. 4-16. (Forestry Sciences).
- MIROV, N. T. **The genus *Pinus***. New York, Ronald Press, 1967. 602p.
- MOTT, R. L. Tree. In: CONGER, B. V., ed. **Cloning agricultural plants via in vitro techniques**. Boca Raton, CRC Press, 1987. p. 217-54.
- MUDGE, K. W. Micropropagation of mugo pine from embryonic and seedling explants. **Hortscience**, Homestead, **21**(2): 298-9, 1986.
- MULLIN, T. J. & PARK, Y. S. Estimating genetic gains from alternative breeding strategies for clonal forestry. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, **22**: 14-23, 1992.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, **15**: 473-97, 1962.
- NAGMANI, R.; DINER, A. M.; SHARMA, G. C. Somatic embryogenesis in longleaf pine (*Pinus palustris*). **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, **23**: 873-6, 1993.
- OWEN, H. R. & MILLER, A. R. An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **28**: 147-50, 1992.

PASQUAL, M. & PINTO, J. E. B. P. Cultura de embriões. **ABCTP Notícias**, Brasília, 9: 2-12, 1988.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Gymnosperms.
In: _____, ed. **Biology of Plants**. 5 ed. New York, Worth Publ., 1992.
Cap. 17, p. 356-79.

ROBERTS, D. R.; FLINN, B. S.; WEBB, D. T.; WEBSTER, F. B.; SUTTON, B. C. S.
Characterization of immature embryos of interior spruce by SDS-PAGE and
microscopy in relation to their competence for somatic embryogenesis, **Plant Cell
Report**, New York, 8: 285-8, 1989.

ROBERTS, D. R.; WEBSTER, F. B.; FLINN, B. S.; LAZAROFF, W. R.; CYR, D. R.
Somatic embryogenesis of spruce. In: REDENBAUGH, K., ed. **Synseeds;**
application of synthetic seeds to crop improvement. Boca Raton, CRC Press,
1993. p. 427-52.

RUAUD, J. N. Recherche d'une relation entre bourgeonnement adventif et
embryogenèse somatique chez des cotylédons de jeunes semis de *Picea abies*;
premiers résultats. **Annales de Recherche Sylvicoles**, Paris, (1989): 23-41.
1991.

RUAUD, J. N. Maturation and conversion into plantlets of somatic embryos derived
from needles and cotyledons of 7-56-day-old *Picea abies*. **Plant Science**,
Limerick, 92: 213-20, 1993.

SANTOS, A. V. P. Embriogênese somática in vitro. **ABCTP Notícias**, Brasília, 5:
2-4, 1987.

- SCHENK, R. U. & HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, 50: 199-204, 1972.
- SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; FLICK, C. E.; SOMMER, H. E. Strategies and specifications for management of in vitro plant propagation. In: ROWMAN & ALLANHELD, ed. Beltsville symposia in agricultural research, Beltsville, 1981. p. 287-303, 1983.
- SILVA, A. A. Morfogênese "in vitro" de diferentes tipos de explantes em progênies de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* BARR. et GOLFARI. Piracicaba, 1989. 149p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SINNOT, E. N. **Plant morphogenesis**. New York, McGraw-Hill, 1960. 550p.
- SOMMER, H. E. Biotechnology insights into woody plant improvement. In: CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R.; MELO, M., ed. **Biotecnologia para producao vegetal**. Piracicaba, CEBTEC/FEALQ, 1991. p. 23-43.
- SOMMER, H. E. & CALDAS, L. S. In vitro methods applied to forest trees. In: THORPE, T. A., ed. **Plant tissue culture; methods and applications in agriculture**. New York, Academic Press, 1981. p. 349-58.
- SUTTON, B. C. S.; GROSSNICKLE, S. C.; ROBERTS, D. R.; RUSSELL, J. H.; KISS, G. K. Somatic embryogenesis and tree improvement in interior spruce. **Journal of Forestry**, Washington, 91(10): 34-8, 1993.
- TARAS, A. M. Properties of uses of loblolly pine. In: SYMPOSIUM OF LOBLOLLY PINE ECOSYSTEM (EAST REGION), Raleigh, 1982. **Proceedings**. Raleigh, 1982. p. 233-45.

- TAUTORUS, T. E.; ATTREE, S. M.; FOWKE, L. C.; DUNSTAN, D. I. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos, and embryo regeneration from protoplasts in Black Spruce (*Picea mariana* Mill.). **Plant Science**, Limerick, **67**: 115-24, 1990.
- TAUTORUS, T. E.; FOWKE, L. C.; DUNSTAN, D. I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **69**: 1873-99, 1991.
- TEASDALE, R. D.; DAWSON, P. A.; WOOLHOUSE, H. W. Mineral nutrient requirements of a loblolly pine (*Pinus taeda*) cell suspension culture. **Plant Physiology**, Rockville, **82**: 942-5, 1986.
- TULECKE, W. Somatic embryogenesis in woody perennials. In: BONGA, J. M. & DURZAN, D. J., ed. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987. v.2: specific principles and methods: growth and development, p. 61-91. (Forestry Sciences).
- WANN, S. R. Somatic embryogenesis in woody species. In: JANICK, J. **Horticultural Review**. Portland, Timber Press, 1989. v.10, cap. 5, p.153-81.
- WEBB, D. T. & VILLALOBOS, V. M. In vitro regeneration of central and south american conifers. In: BONGA, J. M. & DURZAN, D. J., ed. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987. v.2: specific principles and methods: growth and development, p. 166-75. (Forestry Sciences).
- YI, J-S. In vitro plantlet regeneration of loblolly pine, pitch pine and their hybrid. **Journal of Korean Forestry Society**, Suwon, **78**(4): 401-11, 1989.
- ZOBEL, B. J. Loblolly pine in retrospect. In: SYMPOSIUM OF LOBLOLLY PINE ECOSYSTEM (EAST REGION), Raleigh, 1982. **Proceedings**. Raleigh, 1982. p.1-15.

ZOBEL, B. J. & DORMAN, K. W. Loblolly pine as an exotic. **Forest Genetic Resources Information**, Rome, 2: 3-15, 1973.

APÊNDICE

Apêndice 1. Dados Complementares dos Clones de *Pinus taeda* L.**Clone 520 - Coweta County**

- data de estabelecimento : 13.02.74
- altura aproximada : 12.00 m
- D.A.P. : 58.00 cm
- Ferrugem : ausente
- Vigor : excelente

Clone 558 - Heard County

- data de estabelecimento : 13.02.74
- altura aproximada : 10.00 m
- D.A.P. : 55.00 cm
- Ferrugem : ausente
- Vigor : bom

Clone 590 - Morgan County

- data de estabelecimento : 13.02.74
- altura aproximada : 10.00 m
- D.A.P. : 57.00 cm
- Ferrugem : ausente
- Vigor : bom

Clone 615 - Putnam County

- data de estabelecimento : 10.02.70
- altura aproximada : 12.00 m
- D.A.P. : 58.00 cm
- Ferrugem : ausente
- Vigor : excelente

Fonte : Comissão Florestal da Georgia, Milledgeville/GA, 30 de julho de 1993.

Apêndice 2. Meio de Cultura M4 - Composição

Nutrientes Orgânicos		Concentração	Quantidade/Litro de meio
Macronutrientes.....P6.....	5X.....		200 ml
Micronutrientes.....P6.....	100X.....		10 ml
Fe - EDTA.....P6.....	100X.....		10 ml
Suplementos Orgânicos			
Vitaminas.....P6.....	100X.....		1 ml
myo-Inositol.....			100 mg
Aminoácidos			
Asparagina.....			50 mg
Glutamina.....			100 mg
Glicina.....			1g
Caseína Hidrolisada.....			500 mg
Reguladores de Crescimento			
Auxina.....2,4-D.....			11.05 mg
Citocinina.....6-BAP.....			4.51 mg
Cinetina.....			4.30 mg
Giberelina.....			-
Sacarose.....		(3%)	30g/l
pH.....			5.7 a 5.8
Agente solidificante.....GelGro.....		(0.3%)	3g/l

Apêndice 3. Meio de Cultura M5 - Composição

Nutrientes Orgânicos	Concentração	Quantidade/Litro de meio
Macronutrientes.....BMS.....	5X.....	200 ml
Micronutrientes.....MS.....	1000X.....	1 ml
Fe - EDTA.....1/2MS.....	100X.....	5 ml

Suplementos Orgânicos

Vitaminas.....BMS.....	100X.....	1 ml
myo-Inositol.....	Incluído em vitaminas	

Aminoácidos

Asparagina.....	-
Glutamina.....	437 mg
Glicina.....	-
Caseína Hidrolisada.....	500 mg

Reguladores de Crescimento

Auxina.....2,4-D.....	11.10 mg
Citocinina.....6-BAP.....	4.51 mg
Cinetina.....	4.30 mg
Giberelina.....	-

Sacarose.....	(3%) 30g/l
pH.....	5.7 a 5.8
Agente solidificante.....Phytagar.....	(0.5%) 5g/l

Apêndice 4. Meio de Cultura M6 - Composição

Nutrientes Orgânicos		Concentração	Quantidade/Litro de meio
Macronutrientes.....	LPG.....	5X.....	200 ml
Micronutrientes.....	MS.....	1000X.....	1 ml
Fe - EDTA.....	1/2 MS.....	100X.....	5 ml
Suplementos Orgânicos			
Vitaminas.....	LPG.....	100X.....	1 ml
myo-Inositol.....	Incluído em vitaminas		
Aminoácidos			
Asparagina.....	-		
Glutamina.....	200 mg		
Glicina.....	-		
Caseína Hidrolisada.....	-		
Reguladores de Crescimento			
Auxina.....	2,4-D.....	2.20 mg	
Citocinina.....	6-BAP.....	1.10 mg	
Cinetina.....	-		
Giberelina.....	-		
Sacarose.....	(3%) 30g/l		
pH.....	5.7 a 5.8		
Agente solidificante.....	Phytagar.....	(0.5%) 5g/l	

Apêndice 5. Meio de Cultura M7 - Composição

Nutrientes Orgânicos		Concentração	Quantidade/Litro de meio
Macronutrientes.....MS-1.....	10X.....		100 ml
Micronutrientes.....MS-1.....	1000X.....		1 ml
Fe - EDTA.....MS-1.....	100X.....		10 ml
Suplementos Orgânicos			
Vitaminas.....MS-1.....	1000X.....		1 ml
myo-Inositol.....			1000 mg
Aminoácidos			
Asparagina.....			-
Glutamina.....			450 mg
Glicina.....			1 mg
Caseína Hidrolisada.....			500 mg
Reguladores de Crescimento			
Auxina.....2,4-D.....			11.05 mg
Citocinina.....6-BAP.....			4.51 mg
Cinetina.....			4.30 mg
Giberelina.....			-
Sacarose.....	(3%)		30g/l
pH.....			5.7 a 5.8
Agente solidificante.....Phytagar.....	(0.6%)		6g/l

Apêndice 6. Meio de Cultura M8 - Composição

Nutrientes Orgânicos	Concentração	Quantidade/Litro de meio
Macronutrientes.....N6.....	5X.....	200 ml
Micronutrientes.....MS.....	1000X.....	1 ml
Fe - EDTA.....MS.....	100X.....	10 ml

Suplementos Orgânicos

Vitaminas.....N6.....	100X.....	1 ml
myo-Inositol.....	Incluido em vitaminas	

Aminoácidos

Asparagina.....	-
Glutamina.....	100 mg
Glicina.....	-
Caseína Hidrolisada.....	-

Reguladores de Crescimento

Auxina.....2,4-D.....	2.00 mg
Citocinina...6-BAP.....	-
Cinetina.....	1.00 mg
Giberelina.....	-
Sacarose.....	(5%) 50g/l
pH.....	5.7 a 5.8
Agente solidificante.....Phytagar.....	(0.5%) 5g/l

Apêndice 7. Soluções Estoque BMS ou SH - Composição

Macronutrientes	mg/l	Estoque 5X
KNO ₃	2500.00.....	12500.00
NH ₄ H ₂ PO ₄	300.00.....	1500.00
CaCl ₂ .4H ₂ O.....	200.00.....	1000.00
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	400.00.....	2000.00

Vitaminas	mg/l	Estoque 100X
Ácido Nicotínico.....	2.00.....	200.00
Piridoxina HCl.....	1.00.....	100.00
Tiamina HCl.....	5.00.....	500.00
myo - Inositol.....	100.00.....	10000.00

Reguladores de Crescimento	mg/l	Estoque
2,4-D.....	-.....	100 mg/100 ml
ABA.....	-.....	100 mg/100 ml
6-BAP.....	-.....	100 mg/100 ml
Cinetina.....	-.....	100 mg/100 ml
Zeatina.....	-.....	-

Fonte: SCHENK & HILDEBRANDT (1972); LAINE & DAVID (1990).

Apêndice 8. Soluções Estoque P6 - Composição

Macronutrientes	mg/l	Estoque 5X
NH ₄ NO ₃	1200.75.....	6003.75
KNO ₃	1415.40.....	7077.00
KH ₂ PO ₄	672.20.....	3361.00
K ₂ SO ₄	174.30.....	867.00
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O.....	472.40.....	2362.00
Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O.....	1025.60.....	5128.00
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	246.50.....	1232.50
Micronutrientes	mg/l	Estoque 100X
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	19.79.....	1979.00
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	28.75.....	2875.00
H ₃ BO ₃	30.92.....	3092.00
KI.....	8.30.....	830.00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O*.....	0.2420.....	24.20
CuSO ₄ .5H ₂ O*.....	0.2500.....	25.00
CoCl ₂ .6H ₂ O*.....	0.2379.....	23.79
*subestoques para P6 (10.00 mg/l - 10000X - 10.00 mg/ml)		
FeEDTA	mg/l	Estoque 100X
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	27.85.....	2785.00
Na ₂ EDTA.....	37.25.....	3725.00
Vitaminas	mg/l	Estoque 100X
Ácido Nicotínico.....	2.00.....	200.00
Piridoxina HCl.....	1.00.....	100.00
Tiamina HCl.....	5.00.....	500.00
myo - Inositol.....	100.00.....	10000.00
Reguladores de Crescimento	mg/l	Estoque
2,4-D.....	-.....	100mg/100ml
ABA.....	-.....	100mg/100ml
6-BAP.....	-.....	100mg/100ml
Cinetina.....	-.....	100mg/100ml
Zeatina.....	-.....	-

Fonte : TEASDALE et al. (1986).

Apêndice 9. Soluções Estoque MS ou BL - Composição

Macronutrientes	mg/l	Estoque 5X
NH ₄ NO ₃	1650.00.....	8250.00
KNO ₃	1900.00.....	9500.00
KH ₂ PO ₄	170.00.....	850.00
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	440.00.....	2200.00
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	370.00.....	1850.00
Micronutrientes	mg/l	Estoque 100X
MnSO ₄ .4H ₂ O.....	22.30.....	2230.00
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	8.60.....	860.00
H ₃ BO ₃	6.20.....	620.00
KI.....	0.83.....	83.00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	0.25.....	25.00
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0.025.....	2.50
CoCl ₂ .6H ₂ O.....	0.025.....	2.50
FeEDTA	mg/l	Estoque 100X
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	27.85.....	2785.00
Na ₂ EDTA.....	37.25.....	3725.00
Vitaminas	mg/l	Estoque 10X
Ácido Nicotínico.....	0.50.....	5.00
Piridoxina HCl.....	0.50.....	5.00
Tiamina HCl.....	1.00.....	10.00
myo - Inositol.....	100.00.....	1000.00
Reguladores de Crescimento	mg/l	Estoque
2,4-D.....	-.....	100 mg/100 ml
ABA.....	-.....	100 mg/100 ml
6-BAP.....	-.....	100 mg/100 ml
Cinetina.....	-.....	100 mg/100 ml
Zeatina.....	-.....	-

Fonte : MURASHIGE & SKOOG (1962); BROWN & LAWRENCE (1968).

Apêndice 10. Soluções Estoque LPG - Composição

Macronutrientes	mg/l	Estoque 5X
NH ₄ NO ₃	1800.00.....	9000.00
KNO ₃	800.00.....	4000.00
KH ₂ PO ₄	170.00.....	850.00
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	90.00.....	450.00
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	185.00.....	925.00

FeEDTA	mg/l	Estoque 100X
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	27.85.....	2785.00
Na ₂ EDTA.....	37.25.....	3725.00

Vitaminas	mg/l	Estoque 100X
Ácido Nicotínico.....	2.00.....	200.00
Piridoxina HCl.....	1.00.....	100.00
Tiamina Hcl.....	5.00.....	500.00
myo - Inositol.....	100.00.....	10000.00

Reguladores de Crescimento	mg/l	Estoque
2,4-D.....	-.....	100 mg/100 ml
ABA.....	-.....	100 mg/100 ml
BAP.....	-.....	100 mg/100 ml
Cinetina.....	-.....	100 mg/100 ml
Zeatina.....	-.....	-

Fonte : LAINE & DAVID (1990).

Apêndice 11. Soluções Estoque MS1 - Composição

Macronutrientes	mg/l	Estoque 10X
NH ₄ NO ₃	825.00.....	8250.00
KNO ₃	950.00.....	9500.00
KH ₂ PO ₄	85.00.....	850.00
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	220.00.....	2200.00
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	185.00.....	1850.00

Micronutrientes	mg/l	Estoque 1000X
MnSO ₄ .4H ₂ O.....	8.45.....	8450.00
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	4.30.....	4300.00
H ₃ BO ₃	3.10.....	3100.00
KI.....	0.415.....	415.00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	0.125.....	125.00
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0.0125.....	12.50
CoCl ₂ .6H ₂ O.....	0.0125.....	12.50

FeEDTA	mg/l	Estoque 100X
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	13.90.....	1390.00
Na ₂ EDTA.....	18.60.....	1860.00

Vitaminas	mg/l	Estoque 1000X
Ácido Nicotínico.....	0.25.....	250.00
Piridoxina HCl.....	0.25.....	250.00
Tiamina HCl.....	1.00.....	100.00
myo - Inositol.....	1000.00.....	10000.00*
(*obs: 10X)		

Reguladores de Crescimento	mg/l	Estoque
2,4-D.....	-.....	100 mg/100 ml
ABA.....	-.....	100 mg/100 ml
6-BAP.....	-.....	100 mg/100 ml
Cinetina.....	-.....	100 mg/100 ml
Zeatina.....	-.....	-

Fonte : GUPTA & DURZAN (1987a).

Apêndice 12. Soluções Estoque N6 - Composição

Macronutrientes	mg/l	Estoque 5X
KNO ₃	2830.00.....	14150.00
KH ₂ PO ₄	400.00.....	2000.00
(NH ₄) ₂ SO ₄	463.00.....	2315.00
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	166.00.....	830.00
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	185.00.....	925.00
FeEDTA	mg/l	Estoque 100X
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	27.85.....	2785.00
Na ₂ EDTA.....	37.25.....	3725.00
Vitaminas	mg/l	Estoque 100X
Ácido Nicotínico.....	0.50.....	50.00
Piridoxina HCl.....	0.50.....	50.00
Tiamina HCl.....	1.00.....	100.00
myo - Inositol.....	100.00.....	10000.00
Reguladores de Crescimento	mg/l	Estoque
2,4-D.....	-.....	100 mg/100 ml
Cinetina.....	-.....	100 mg/100 ml

Fonte : CHU et al. (1975).