

SILVANA CRUZ DA ROCHA

**CONTROLE DE MORFOGÊNESE DO MOGNO (*Swietenia macrophylla* King)
CULTIVADO *IN VITRO***

**Monografia apresentada à disciplina
Estágio em Botânica do curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná, para obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biológicas.**

Orientadora: Marguerite G. G. Quoirin

CURITIBA

2002

Agradecimentos

aos meus familiares, pelo apoio e paciência durante minha vida acadêmica.

Aos meus amigos da graduação e do laboratório de micropropagação, com os
quais pude compartilhar experiências, momentos bons e ruins.

A professora Dra Marguerite G. G. Quoirin pela ajuda e dedicação na orientação
desta monografia.

Enfim a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desta monografia.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
3.1. EXPERIMENTO: EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS CRESCIDAS <i>IN VITRO</i> NOS MEIOS COM CIN E ANA.....	8
3.2. EXPERIMENTO: EXPLANTES FOLIARES, TERCEIRA E QUARTA FOLHAS DE PLANTAS MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO, MEIOS COM TDZ E 2,4-D.....	9
3.3. EXPERIMENTO: EXPLANTES DE RAÍZES SECUNDÁRIAS DE PLANTAS CRESCIDAS <i>IN VITRO</i> , COM 150 DIAS DE IDADE, NOS MEIOS COM CIN E ANA.....	11
3.4. EXPERIMENTO: EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS GERMINADAS <i>IN VITRO</i> , NOS MEIOS COM BA E ANA.....	12
3.5. EXPERIMENTO: EXPLANTES FOLIARES, TERCEIRA E QUARTA FOLHAS DE PLANTAS MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO, NOS MEIOS COM BA E ANA.....	13
3.6. EXPERIMENTO: EXPLANTES DE RAÍZES SECUNDÁRIAS DE PLANTAS CRESCIDAS <i>IN VITRO</i> , NOS MEIOS COM BA E ANA.....	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1 EXPERIMENTO 3.1: EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS CRESCIDAS <i>IN VITRO</i> NOS MEIOS COM CIN E ANA.....	15
4.2 EXPERIMENTO 3.2: EXPLANTES FOLIARES, TERCEIRA E QUARTA FOLHAS DE PLANTAS MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO, MEIOS COM TDZ E 2,4-D.....	18

4.3	EXPERIMENTO 3.3 EXPLANTES DE RAÍZES SECUNDÁRIAS DE PLANTAS CRESCIDAS <i>IN VITRO</i> , COM 150 DIAS DE IDADE, NOS MEIOS COM CIN E ANA.....	25
4.4	EXPERIMENTO 3.4: EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS GERMINADAS <i>IN VITRO</i> , NOS MEIOS COM BA E ANA.....	26
4.5	EXPERIMENTO 3.5: EXPLANTES FOLIARES, TERCEIRA E QUARTA FOLHAS DE PLANTAS MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO, NOS MEIOS COM BA E ANA.....	31
4.6	EXPERIMENTO 3.6: EXPLANTES DE RAÍZES SECUNDÁRIAS DE PLANTAS CRESCIDAS <i>IN VITRO</i> , NOS MEIOS COM BA E ANA.....	34
5.	DISCUSSÃO	36
6.	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
	APÊNDICES	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Calogênese a partir de explantes foliares de planta de mogno mantida na casa de vegetação.....	42
FIGURA 2 – Calos verdes de mogno obtidos a partir de explantes foliares de planta da casa de vegetação.....	42
FIGURA 3 – Formação de calos a partir de raízes de plantas de mogno crescidas <i>in vitro</i>	43
FIGURA 4 – Formação de raízes a partir de explantes foliares de mogno de plantas crescidas <i>in vitro</i>	43

CONTROLE DE MORFOGÊNESE DO MOGNO (*Swietenia macrophylla* King) CULTIVADO *IN VITRO*

A exploração de madeira realizada de forma indiscriminada, buscando espécies de alto valor econômico, têm levado várias espécies ao perigo de extinção e uma delas é o mogno (*Swietenia macrophylla*). A madeira do mogno possui características apreciadas na fabricação de móveis. Por essa razão, essa espécie sofre uma exploração intensiva. O desenvolvimento de uma metodologia de regeneração de gemas, direta ou indireta, poderia auxiliar na obtenção de um grande número de mudas e no estabelecimento de um protocolo de transformação genética da espécie. Com o objetivo de desenvolver essa metodologia, foram utilizados três tipos de explantes: fragmentos foliares de plantas mantidas em casa de vegetação e, fragmentos foliares e de raízes de plantas cultivadas *in vitro*. Os explantes sofreram desinfestação em etanol, hipoclorito de sódio e enxágües em água estéril. Em seguida, foram colocados em meio de cultura Murashige e Skoog MS (1962) contendo três quartos de sais, vitaminas do mesmo meio, 30gL^{-1} de sacarose, auxinas (ANA e 2,4-D), citocininas (CIN, BA, TDZ e 2 IP) e 7gL^{-1} de ágar (Agar Granulated Becton Dickinson). As variáveis testadas foram a concentração e o tipo de regulador de crescimento, a origem dos explantes e a presença ou não de luz durante a cultura. A cada 30 dias, os explantes foram avaliados, através da contagem do número de explantes formando calos e a consistência dos calos, com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Foram obtidos calos a partir dos três tipos de explantes. Nos explantes foliares de plantas mantidas em casa de vegetação o maior número de calos foi obtido em meios de cultura com TDZ $0,18\ \mu\text{M.L}^{-1}$ e $0,27\ \mu\text{M.L}^{-1}$ combinados, respectivamente, com 2,4-D $9,1$ e $4,5\ \mu\text{M.L}^{-1}$, na ausência de luz. Já, para explantes foliares de plantas crescidas *in vitro*, os meios com BA $4,4\ \mu\text{M.L}^{-1}$ e ANA $0,54\ \mu\text{M.L}^{-1}$ e BA $8,9\ \mu\text{M.L}^{-1}$ com ANA $0,11$ e $0,54\ \mu\text{M.L}^{-1}$, induziram o maior número de calos. Em raízes crescidas *in vitro* utilizadas como explantes, um dos maiores números de calos foi obtido no meio de cultura com BA $2,2\ \mu\text{M.L}^{-1}$ e ANA $0,54\ \mu\text{M.L}^{-1}$, com 33 calos em 22 explantes de um total de 40. Raízes foram obtidas a partir de calos e/ou do limbo foliar, nos explantes foliares das plantas mantidas em casa de vegetação e crescidas *in vitro*, em meios de cultura com CIN e ANA. Entretanto não foi obtida a formação de gemas.

Palavras-chave: micropropagação; calogênese; Meliaceae.

1 INTRODUÇÃO

Na floresta Amazônica, a extração de madeira é a principal atividade comercial. Como a exploração é realizada de forma indiscriminada, buscando espécies de alto valor econômico, tem ocorrido alterações drásticas dos ecossistemas desta formação florestal, colocando em perigo de extinção várias espécies, como o mogno por exemplo.

O mogno (*Swietenia macrophylla* King) espécie pertencente à família Meliaceae, possui folhas compostas e uma altura variando entre 25-30 m. Essa espécie está presente não só na Amazônia, mas também em outras regiões do Brasil, sendo particularmente freqüente na região sul do Pará (LORENZI, 1996).

É uma espécie arbórea de grande porte, com folhagem densa e seu fruto é uma cápsula lenhosa que contém numerosas sementes aladas (AMARAL, 1981). As sementes são dispersadas pelo vento e freqüentemente escapam da predação (JANZEN, 1988).

A longevidade das sementes, quando armazenadas, é variável, e objeto de estudos. De acordo com MARRERO (1943) o armazenamento de sementes do mogno à baixa temperatura pode conservar a viabilidade por mais de três meses até um ano. Em outros estudos, de germinação e longevidade, LEMOS (2001) confirmou que, de modo geral, as sementes mantidas em baixa temperatura apresentam maior percentagem de germinação (90%, após um ano de estocagem).

A regeneração natural do mogno é baixa. Em levantamentos realizados em área de corte, foi encontrada 0,25 árvores/ ha de DAP (diâmetro na altura do peito) igual ou superior a 30 cm, sendo que nessas áreas as mudas são raras (VERRISSIMO et al., 1995).

Técnicas de cultivo *in vitro* podem ser usadas para permitir uma multiplicação rápida, quando comparadas com as demais técnicas de propagação assexuada. Com a utilização da micropropagação *in vitro* existe a possibilidade de aumentar o número de propágulos e conseqüente a multiplicação da espécie vegetal. Desta maneira, a espécie nativa poderá ser preservada no ecossistema no qual está inserida, interagindo e recebendo interações de outras espécies, pois a exploração será reduzida. Ainda, mediante estas técnicas, genótipos novos poderão ser produzidos após inserção de genes nas células da planta, uma possível aplicação

importante deste método seria a obtenção de plantas resistentes a insetos, como *Hypsipyla grandella*, cujo ataque causa grandes estragos em plantios comerciais de mogno, pois se não causar a morte da árvore pode provocar bifurcações do ramo principal, impossibilitando seu uso madeireiro (YAMAZAKI et al., 1990) .

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo de regeneração de gemas adventícias a partir de explantes de folhas e raízes do mogno; o qual, uma vez obtido, poderá ser utilizado posteriormente para o desenvolvimento de novos genótipos pela transformação genética, ou para a micropropagação da espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na exploração do mogno, quando são retiradas árvores adultas, muitos indivíduos jovens são destruídos tanto do mogno como de outras espécies, já que a espécie explorada ocorre normalmente em grupos e são utilizadas máquinas pesadas para a retirada das árvores derrubadas, causando, também, frequentemente a compactação do solo, o que impede a germinação de sementes (GRAÇA, com. pessoal, 2000). Como em outras espécies madeiráveis, as técnicas de derrubada são: a derrubada seletiva de um número pequeno de espécies, seguida de corte e queima da vegetação ao redor. Isso pode destruir propágulos, brotações e bancos naturais de sementes, prejudicando futuras regenerações.

A madeira do mogno é a mais valiosa da Amazônia (VERISSIMO et al., 1995) e a primeira em volume explorado, com 899.105,52 toneladas exportadas no período de 1980-1992 (BRASIL, 1992). Sua exploração excessiva pode ter efeitos drásticos que vão desde à redução da população natural e conseqüentemente da sua variabilidade genética, até a extinção da espécie, a qual pode iniciar uma cadeia de reações levando à extinção até de grupos inteiros de espécies, devido à interdependência entre elas (FRANKEL & SOULÉ, 1981).

Essa exploração intensiva do mogno é devida às características e utilidades da madeira, como fabricação de móveis de luxo, acabamentos internos em construção civil para confecção de rodapés, molduras, assoalhos e venezianas. A madeira ainda possui a vantagem de ter alta resistência ao ataque de cupins de madeira seca (LORENZI, 1996). No momento, a extração da madeira do mogno está proibida por lei.

Trata-se de uma espécie monóica com sementes dispersadas pelo vento. O número destas por quilograma varia de 1300 a 2200, sendo o índice de germinação das sementes recém dispersadas variável (85 % a 97%) e também pode atingir 60% (LAMPRECHT, 1990).

A regeneração de plântulas através de técnicas *in vitro* é pré - condição para inserção de genes com o objetivo de tornar a planta resistente ao ataque da *Hypsipyla grandella*.

No que se refere ao cultivo *in vitro* do mogno, pouco se sabe a respeito da metodologia para regeneração de plantas a partir de explantes foliares e raízes.

ALBARRÁN e seus colaboradores (1997) utilizaram segmentos foliares de mogno colocados em meio de MURASHIGE e SKOOG (MS, 1962) contendo a metade de sua concentração de sais, no qual obtiveram uma maior resposta, em termos de regeneração de calos na presença de Tidiazuron (TDZ) ($0,9 \mu\text{M}$) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ($22,6 \mu\text{M}$).

A regeneração de gemas adventícias a partir de explantes foliares do *Eucalyptus dunnii*, foi obtida no meio MS com cálcio diluído a 1/6 e com BA e ANA num balanço de 5:1, regeneração de gemas axilares (JOBIN & TERMIGNONI, 1989). A partir de calos de flores de *Dalbergia sissoo*, colocados no meio MS (1962) sem auxinas, com BA $2,2-8,8 \mu\text{M}$ foi alcançada a regeneração por HOSSAIN et al. (1994). A obtenção de dois tipos de calos, etapa da regeneração indireta, foi obtida também a partir de hipocótilos de *Eucalyptus urophylla*. Somente os calos compactos foram capazes de regeneração de brotos, no meio MS com TDZ $2,3 \mu\text{M}$ (TIBOK et al., 1995).

Outras espécies da família Meliaceae, além do mogno, tiveram seus tecidos cultivados *in vitro*: folhas e raízes das espécies *Naregamia alata*, *Azadirachta excelsa* e *Azadirachta indica* ("neem"). Estes serviram de base para obtenção de calos e, em alguns casos, de brotos (SHAJI et al., 1997; SALVI et al., 2001; GIAGNACOVO et al., 2001).

Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante para o cultivo *in vitro* (TORRES et al., 2000). O explante é um segmento de tecido ou órgão vegetal retirado do seu sítio natural e utilizado para iniciar uma cultura. Essa possibilidade se baseia na teoria da totipotência das células vegetais (TORRES et al., 1998), a qual se manifesta em momentos diferentes e sob estímulos apropriados. É a potencialidade em iniciar um novo indivíduo a partir de explantes unicelulares ou pluricelulares (TORRES et al., 2000).

A regeneração a partir dos explantes pode ser direta, quando a diferenciação em gemas se dá diretamente sem a passagem pela fase de calo, ou indireta, quando se forma primeiro um calo (grupo ou massa de células com crescimento desordenado), o qual posteriormente se diferencia em gemas (TORRES et al., 2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Três tipos de explantes foram utilizados: fragmentos de folhas de 36 mm² com nervuras e de raízes com 6 mm de comprimento, de plantas provenientes de sementes germinadas *in vitro*, e explantes foliares do mesmo tamanho de plantas mantidas na casa de vegetação do Departamento de Botânica (ver tabela 1), na qual apenas a intensidade luminosa é menor com relação ao meio externo. Os fragmentos de folhas foram obtidos após o corte das bordas. As nervuras foram mantidas.

O meio de básico foi o meio MS com três quartos da concentração de sais e concentração de vitaminas normal, 30 g.L⁻¹ sacarose e 7g.L⁻¹ ágar (Agar "Granulated" Becton Dickinson). O pH do meio foi ajustado em 5,8 antes da adição do ágar. Os meios foram autoclavados a 120°C por 20 minutos.

Os fatores estudados foram a concentração e tipo de regulador de crescimento e a origem dos explantes. Foram testadas várias combinações de citocininas [cinetina (CIN), benziladenina (BA), Tidiazuron (TDZ) e isopenteniladenina (2iP)] e auxinas [ácido naftaleno-acético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)] (ver tabelas 1 e 2). Em seguida, os calos foram transferidos aos meios indicados nas tabelas 3 e 4.

Os explantes foram colocados em placas de petri contendo 20 ml de meio de cultura sólido. A superfície abaxial dos explantes foliares ficou em contato direto com os meios e as culturas foram acondicionadas na câmara de crescimento do Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica, onde a temperatura varia de 17 a 27°C, a intensidade luminosa é de $\pm 40 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e o fotoperíodo de 16 horas.

Os calos obtidos foram avaliados sob microscópio estereoscópio considerando os seguintes critérios: número de calos por explante, número de explantes produzindo calos e se os calos são friáveis ou compactos (foi levado em consideração que os calos friáveis, F, e compactos, C, têm aspectos semelhantes ao da figura 1). A taxa de calogênese foi calculada dividindo o número total de calos (N3) pelo número de explantes com calos (N1). Já a percentagem de explantes com calos foi obtida pela divisão do número de explantes com calos (N1) pelo número total de explantes (N2).

Para análise dos dados foi aplicado o teste não paramétrico do Qui-quadrado.

TABELA 1 - ORIGEM DOS EXPLANTES, IDADE DAS MATRIZES, MEIOS DE CULTURA INICIAIS E TRATAMENTOS LUMINOSOS APLICADOS NOS EXPERIMENTOS DO MOGNO

EXPLANTE	ORIGEM	EXPERIMENTO	MEIOS DE CULTURA	IDADE APROX. DAS PLANTAS MATRIZES	ILUMINAÇÃO (LUZ)	
folhas	<i>in vitro</i>	3.1.1		150 dias	Ausência	
		3.1.2	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6	210 dias	Ausência	
		3.1.3		60 dias	Ausência	
	telado	3.2.1	7 e 8		4 anos	Presença
		3.2.2			4 anos	Presença e ausência
		3.2.3				
		3.2.4	0, 1, 2, 3, 4	4 anos e 2 meses	Ausência	
		3.2.5	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6	4 anos e 4 meses	Ausência	
		3.2.6	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6	4 anos e 7 meses	Ausência	
raízes	<i>in vitro</i>	3.3.1		4 anos e 8 meses	Ausência	
		3.3.2	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6	150 dias	Presença e Ausência	
folhas	<i>in vitro</i>	3.4.1		220 dias	Presença	
		3.4.2	0, 1.1, 2.2, 3.3, 4.4, 5.5 e 6.6	90 e 160 dias	Ausência	
		3.4.3		90 dias	Ausência	
	telado	3.5.1			99 dias	Ausência
		3.5.2	0, 1.1, 2.2, 3.3, 4.4, 5.5 e 6.6	4 anos e 9 meses	Ausência	
		3.5.3		4 anos e 11 meses	Ausência	
raízes	<i>In vitro</i>	3.6.1		2 anos e meio	Ausência	
		3.6.2	0, 1.1, 2.2, 3.3, 4.4, 5.5 e 6.6	Entre 90 e 160 dias	Ausência	
		3.6.3		107 dias	Ausência	

TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES (EM MG.L⁻¹ - μ M) DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO DOS MEIOS DE CULTURA, UTILIZADOS NA CULTURA DE EXPLANTES FOLIARES

MEIOS DE CULTURA	CIN	ANA	MEIOS DE CULTURA	BA	ANA
0	0	0	1.1	0,5 - 2,2	0,02 - 0,11
1	0,5 - 2,3	0,02 - 0,11	2.2	0,5 - 2,2	0,10 - 0,54
2	0,5 - 2,3	0,10 - 0,54	3.3	1 - 4,4	0,02 - 0,11
3	1 - 4,7	0,02 - 0,11	4.4	1 - 4,4	0,10 - 0,54
4	1 - 4,7	0,10 - 0,54	5.5	2 - 8,8	0,02 - 0,11
5	2 - 9,3	0,02 - 0,11	6.6	2 - 8,8	0,10 - 0,54
6	2 - 9,3	0,10 - 0,54	14	1 - 4,4	1 - 5,37
	TDZ	2,4-D			
7	0,04 - 0,18	2 - 9,1			
8	0,06 - 0,27	1 - 4,5			

TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO (EM MG.L⁻¹ - μ M) UTILIZADOS NA SUBCULTURA DOS CALOS OBTIDOS NOS MEIOS 1 A 8

MEIOS DE CULTURA	TDZ	2,4-D	BA	2IP	ANA
9	0,02 - 0,09	0,5 - 2,3	0	0	0
11	0	0	0,2 - 0,88	0,5 - 2,5	1 - 5,4
12	0	0	0,2 - 0,08	0,5 - 2,5	0,2 - 1,1

TABELA 4 - CONCENTRAÇÕES (EM MG.L⁻¹ - μ M) DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO UTILIZADOS NA SUBCULTURA DOS CALOS OBTIDOS NOS MEIOS 1.1 AO 6.6

MEIOS DE CULTURA	BA	2IP	CIN	ANA
12	0,2 - 0,88	0,5 - 2,5	0	0,2 - 1,1
15	0	0	0,25 - 0,88	0,5 - 2,7
16	0	0	0,25 - 0,88	1,0 - 5,4

3.1 EXPERIMENTO : EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS CRESCIDAS *IN VITRO* NOS MEIOS COM CIN E ANA

Experimento 3.1.1

Os explantes foliares medindo 6 cm por 6 cm, foram colocados com a superfície abaxial em contato com os meios de 0 a 6 (ver tabela 2), em quatro placas por meio de cultura num total de 28 placas com 5 fragmentos cada, sem desinfestação (nos outros experimentos houve desinfestação devido à testes preliminares, que demonstraram essa necessidade) e foram mantidos na câmara de crescimento.

Experimento 3.1.2

Os explantes sofreram desinfecção em etanol (96%), em seguida permaneceram em hipoclorito de sódio a 6% por quinze minutos e então foram enxaguados em água estéril três vezes. Depois foram transferidos para os meios 0 a 6, em quatro placas por meio, com 5 fragmentos cada e mantidos na câmara de crescimento.

Experimento 3.1.3

Os explantes sofreram desinfecção e distribuição nos meios idem ao experimento anterior, com a exceção de que foram enxaguados em água estéril com Polyvinylpurrolidon PVP (1g.L^{-1}) por três vezes para evitar a oxidação dos tecidos.

3.2 EXPERIMENTO : EXPLANTES FOLIARES, GERALMENTE TERCEIRA E QUARTA FOLHAS, DE PLANTA DA CASA DE VEGETAÇÃO

Experimento 3.2.1

A desinfecção dos explantes foi realizada da seguinte maneira: vinte segundos em etanol (96%), dez minutos em hipoclorito de sódio 2%, sendo em seguida enxaguados por três vezes em água esterilizada e transferidos para os meios de cultura 7 e 8. No total foram utilizadas 12 placas, com 4 explantes cada placa, sendo 6 placas para cada tratamento.

Os explantes foram analisados após 30 e, aos 60 dias foram colocados nos meios 0 e 9. Onde permaneceram por 30 dias. A seguir, foram transferidos para o meio 9, onde permaneceram mais 30 dias e em seguida para o meio 11. Depois de 60 dias, esses explantes foram transferidos para o meio 12 e, após 30 dias, novamente para o meio 11.

Experimento 3.2.2

Os explantes foram desinfestados durante vinte segundos em etanol (96%), seguido de dez minutos em hipoclorito de sódio 2,4% e enxaguados três vezes em água estéril. Foram distribuídos em 20 placas, nos meios 7 e 8, das quais 10 placas foram mantidas à luz e 10 no escuro, com 4 explantes em cada placa. As avaliações foram realizadas após 30 dias e 60 dias, e após está última, distribuídos em número igual entre os meios 0 e 9. Decorridos 60 dias, os explantes foram transferidos para o meio 11, onde permaneceram por igual período. Em seguida, foram avaliados e repicados para o meio 12, após 30 dias, foram novamente transferidos para o meio 11.

Experimento 3.2.3

Os explantes, após sofrerem a mesma desinfestação que no experimento anterior, foram transferidos para os meios 7 e 8, num total de 14 placas, sendo a metade para cada meio, com 4 explantes em cada placa. Decorridos 60 dias, foram

distribuídos entre os meios 0 e 9. Após o mesmo período, foram avaliados e transferidos para o meio 11, no qual permaneceram por aproximadamente 60 dias.

Experimento 3.2.4

As folhas foram desinfetadas por 20 segundos em etanol (96%), em seguida 20 minutos em hipoclorito de sódio 1,5% e depois foram enxaguadas três vezes em água estéril. Então foram colocadas nos meios 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6, sendo 4 placas por meio com 5 explantes cada. Após trinta dias, os explantes foram analisados e transferidos para os mesmos meios. Depois de um período de 60 dias, os explantes foram colocados no meio 11.

Experimento 3.2.5

As folhas foram desinfetadas por 20 segundos em etanol (96%), em seguida 15 minutos em hipoclorito de sódio 2% e depois enxaguadas três vezes em água estéril com PVP (1g.L^{-1}). Em seguida, os explantes foram colocadas nos meios 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6, sendo 4 placas por meio, com 5 explantes cada.

Experimento 3.2.6

Repetição do experimento 3.2.5, com a exceção de que os explantes foram transferidos para o meio 11, onde permaneceram por 60 dias e depois foram colocados no meio 19.

3.3 EXPERIMENTO : EXPLANTES RAÍZES SECUNDÁRIAS DE PLANTAS CRESCIDAS *IN VITRO*, COM 150 DIAS, NOS MEIOS COM CIN E ANA

Experimento 3.3.1

Os explantes utilizados foram desinfectados por 20 segundos em etanol (96%), 7 minutos em hipoclorito de sódio a 2,4% e enxaguados três vezes em água estéril. Em seguida, foram colocados nos meios 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 e mantidos na luz. O número de placas foi 4 por meio, com 10 explantes por placa.

Experimento 3.3.2

Os explantes foram desinfectados em etanol (96%), imersos por 10 minutos em hipoclorito de sódio a 2,4% e enxaguados três vezes em água estéril com PVP (1g.L^{-1}). Os explantes foram colocados nos meios 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 e mantidos por uma semana no escuro. O número de placas utilizadas e o número de explantes por placa foram os mesmos do experimento anterior.

3.4 EXPERIMENTO : EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS GERMINADAS *IN VITRO* NOS MEIOS COM BA E ANA

Experimento 3.4.1

Os explantes foliares sofreram desinfecção em etanol (96%), em seguida foram imersos por 15 minutos em hipoclorito de sódio a 0,6% e enxaguados três vezes em água estéril com PVP (1g.L^{-1}). Então foram colocados nos meios 0, 1.1, 2.2, 3.3, 4.4, 5.5 e 6.6, sendo cinco explantes em cada placa, num total de 4 placas por meio. Após 60 dias foram avaliados e transferidos para os meios 0 e 12.

Experimento 3.4.2

Os explantes utilizados foram desinfectados em etanol (96%), imersos por 8 minutos em hipoclorito de sódio a 0,6% e enxaguados três vezes em água estéril com PVP (1g.L^{-1}). Depois foram colocados nos meios e distribuídos igualmente ao experimento 3.4.1.

Após 60 dias os explantes foram avaliados novamente e transferidos para o meio 15.

Experimento 3.4.3

Idem ao experimento 3.4.2, diferindo apenas na idade dos explantes, nove dias mais velhos, e na transferência para o meio 16 após 60 dias.

3.5 EXPERIMENTO : EXPLANTES FOLIARES, GERALMENTE TERCEIRA E QUARTA FOLHAS, DE PLANTAS DA CASA DE VEGETAÇÃO

Experimento 3.5.1

Os explantes sofreram desinfecção em etanol (96%) por 20 segundos, imersão por 15 minutos em hipoclorito de sódio a 1,8% e três enxágües em água estéril com PVP (1g.L^{-1}). Em seguida foram transferidos para os meios 0, 1.1, 2.2, 3.3, 4.4, 5.5 e 6.6, em 4 placas por meio num total de 28 placas, sendo cinco explantes por placa.

Depois de 60 dias os explantes foram avaliados novamente e repicados para o meio 12.

Experimento 3.5.2

A desinfecção dos explantes foi semelhante a do experimento 3.5.1. Os meios utilizados foram os mesmos e o total de placas foi 21, três placas por meio, com 10 explantes por placa.

Depois de 60 dias os explantes foram transferidos para o meio 15.

Experimento 3.5.3

Procedimento idêntico ao experimento anterior. Após 60 dias, foram transferidos para o meio 16.

3.6 EXPERIMENTO : EXPLANTES RAÍZES SECUNDÁRIAS DE PLANTAS CRESCIDAS *IN VITRO* NOS MEIOS COM BA E ANA

Experimento 3.6.1

Foram utilizados explantes desinfestados em etanol (96%), imersos por 8 minutos em hipoclorito de sódio a 2% e enxaguados três vezes em água estéril com PVP (1g.L^{-1}). Em seguida foram transferidos para os meios 0, 1.1, 2.2, 3.3, 4.4, 5.5 e 6.6, sendo 4 placas por meio, com 10 explantes cada placa.

Depois de um período de 60 dias os explantes foram repicados para os meios 15 e 16.

Experimento 3.6.2

Repetição do experimento 3.6.1, com exceções: a idade dos explantes (ver tabela 1) e a transferência após 60 dias foi somente para o meio 16.

Experimento 3.6.3

Foram utilizados explantes com aproximadamente 110 dias de idade, os quais sofreram desinfestação em etanol (96%) um enxágue de 20 segundos, imersão por 8 minutos em hipoclorito de sódio a 0,6% e enxaguados três vezes em água estéril com PVP (1g.L^{-1}). Em seguida foram transferidos para os meios 0, 1.1, 2.2, 3.3, 4.4, 5.5 e 6.6, em 4 placas por meio, com 10 explantes por placa.

Após o período de 60 dias os explantes foram repicados para o meio 15.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 3.1: EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS CRESCIDAS *IN VITRO* NOS MEIOS COM CIN E ANA

Experimento 3.1.1

A calogênese só foi observada nos explantes cultivados nos meios 3 (CIN 4,7 μ M e ANA 0,11 μ M), 4 (CIN 4,7 μ M e ANA 0,54 μ M) e 6 (CIN 9,3 μ M e ANA 0,54 μ M) não havendo uma diferença significativa entre os três tratamentos, nem na percentagem de explantes formando calos nem na taxa de calogênese (ver tabela 4 e apêndice, tabela 2). Este resultado indica que uma concentração de CIN a 2,3 μ M foi insuficiente para induzir a formação de calos, quando combinado a 0,11 ou 0,54 μ M de ANA. Já a concentração de CIN a 4,7 μ M combinada com 0,11 e 0,54 μ M de ANA, e 9,3 μ M com 0,54 μ M de ANA, induziram a calogênese, embora a taxa de calogênese seja baixa (25%).

Experimento 3.1.2

Foi observada a presença de calos apenas nos meios 2 (CIN 2,3 e ANA 0,54 μ M) e 5 (CIN 9,3 μ M e ANA 0,11 μ M) (ver tabela 4 e apêndice, tabela 3).

Comparando os experimentos 3.1.1 e 3.1.2, sob as mesmas condições, pode ser verificada uma diferença de resultado, com relação a calogênese nos diferentes meios. Esse resultado pode ser devido à diferença de idade dos explantes utilizados ou épocas dos experimentos (ver tabela 1).

Experimento 3.1.3

Na avaliação dos explantes após 30 dias, pode ser observada a calogênese nos meios 1 (CIN 2,3 e ANA 0,11 μ M), 2 (CIN 2,3 e ANA 0,54 μ M), 4 (CIN 4,7 e ANA 0,54) e 5 (CIN 9,3 e ANA 0,11 μ M) a taxa de calogênese foi baixa, porém maior que no experimentos 3.1.1 e 3.1.2 (ver tabela 4 e apêndice, tabela 4). A diferença no resultado com relação à calogênese, entre os experimentos 3.1.1, 3.1.2 e 3.1.3,

provavelmente foi devida à diferença de idade dos explantes. As idades dos explantes foram 150, 210 e 60 dias respectivamente e o maior número de calos foi obtido nos explantes que foram retirados de plantas mais jovens e cultivados no meio 4. Nos meios 3 (CIN 4,7 e ANA 0,11 μM), 4, 5 e 6 (CIN 9,3 e ANA 0,54 μM), alguns explantes apresentaram raízes adventícias, um explante de vinte no meio 3, 2 explantes de 10 no meio 4, um explante de 20 no meio 5 e no meio 6 dois explantes com raízes dentre 20 explantes. A maioria das raízes foi observada na superfície adaxial dos explantes foliares. A formação de raízes também pode ser influenciada pela idade das plantas, já que as raízes só puderam ser observadas após 30 dias nos meios citados e no experimento 3.1.3. Entretanto, os explantes mantidos por 60 dias no meio 2 (Experimento 3.1.2) também desenvolveram raízes, porém em menor número, duas raízes, em comparação com 12 do experimento 3.1.3. Logo podemos concluir que certas combinações de CIN e ANA podem induzir a formação de calos e também a formação de raízes (ambos em pouca quantidade). As combinações de CIN 4,7 e ANA 0,11 μM e a 0,54 μM foram as que induziram os maiores números de raízes com 4 raízes em cada meio (meios 3 e 4).

Com relação a taxa de calogênese, a qual leva em consideração o número total de calos pelo número de explantes com calos, as concentrações de CIN a 4,7 μM e 9,3 μM combinadas, respectivamente, com ANA a 0,54 e 0,11 μM , (meios 4 e 5) mostraram os melhores resultados. No entanto no experimento 3.1.1 foi detectado resultados diferentes dos outros experimentos, isso pode ser devido à idade das plantas matrizes, das quais foram retirados os explantes ou fatores não determinados (ver tabela 4).

TABELA 4 - EFEITO DE COMBINAÇÕES DE CIN E ANA NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS DE MOGNO CULTIVADAS *IN VITRO*, DEPOIS DE 30 DIAS NA AUSÊNCIA DE LUZ

A) Percentagem de explantes com calos

CONCENTRAÇÃO (μ M)		EXPERIMENTO		
CIN	ANA	3.1.1	3.1.2	3.1.3
2,3	0,11	0	0	10
2,3	0,54	0	25	10
4,7	0,11	19	0	0
4,7	0,54	25	0	70
9,3	0,11	0	6	10
9,3	0,54	25	0	0

B) Taxa de calogênese

CONCENTRAÇÃO (μ M)		EXPERIMENTO		
CIN	ANA	3.1.1	3.1.2	3.1.3
2,3	0,11	0	0	1,5
2,3	0,54	0	1,3	1
4,7	0,11	2,3	0	0
4,7	0,54	22	0	4
9,3	0,11	0	1	5
9,3	0,54	2	0	0

4.2 EXPERIMENTO 3.2: EXPLANTES FOLIARES, GERALMENTE TERCEIRA E QUARTA FOLHAS, DE PLANTA DA CASA DE VEGETAÇÃO

Experimento 3.2.1

Quando foram utilizados explantes de folhas de planta da casa de vegetação, houve calogênese em 100% dos casos nos dois meios 7 (TDZ 0,18 e 2,4-D 9,1 μM) e 8 (TDZ 0,27 e 2,4-D 4,5 μM). Foram observados calos de coloração branca, verde e parda, com a taxa de calogênese sendo superior no meio 7 (ver tabela 5).

TABELA 5 - FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE PLANTA DE MOGNO MANTIDA EM CASA DE VEGETAÇÃO, APÓS 30 DIAS

MEIOS DE CULTURA	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)
7	100 (8/8)	22,6 (181/8)
8	100 (11/11)	12,8 (141/11)

Depois de 60 dias nos meios 7 e 8, foi observado um aumento no número de calos, porém quando os explantes foram transferidos aos meios 0 e 9, o número de calos continuou aproximadamente igual.

Nesse experimento os explantes foram transferidos ao meio 11, com BA a 0,9 μM combinado a 2iP 2,5 μM e a ANA 5,4 μM , novos calos verdes de consistência compacta tiveram origem a partir de calos escuros compactos ou da própria folha, nas superfícies abaxial e adaxial, aumentando assim o número de calos de 68 para 118 de coloração verde (ver Figura 2).

No meio 12 (BA 0,9 μM e 2iP 2,5 μM e ANA a 1,1 μM), foi observada uma diminuição no número de calos verdes para 89 e aumento de calos pardos.

Experimento 3.2.2

Houve uma elevada formação de calos, nos dois meios 7 e 8, atingindo 100% quando os explantes foram mantidos no escuro. A taxa de calogênese foi mais elevada quando os explantes foram mantidos no escuro e no meio 7, e aumentou no período de avaliação de 30 e 60 dias (ver apêndice, tabela 6).

Em geral, o número de calos nos meios 0 e 9 (TDZ 0,09 μM e 2,4-D 2,3 μM) depois de 30 dias nesses meios, continuou aproximadamente igual com uma pequena variação ver tabela 6, quando comparado aos meios anteriores 7 e 8. No entanto, a variação do número de calos pode ser devida à dificuldade de avaliação, uma vez que os calos cresceram e se uniram.

Não houve diferenciação de gemas nos calos.

TABELA 6 - CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE PLANTA DA CASA DE VEGETAÇÃO, MANTIDOS NO ESCURO E NA LUZ, APÓS O SUBCULTIVO

MEIOS DE CULTURA INICIAIS	APÓS 60 DIAS, % DE EXPLANTES COM CALOS(N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)	MEIOS DE CULTURA DO SUBCULTIVO	APÓS 30 DIAS %, DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)
7	100 (8/8)	50 (400/8)	9	100 (8/8)	49,50(396/8)
8	100 (8/8)	54,37 (435/8)		100 (8/8)	49,37(395/8)
7	100 (3/3)	53 (168/6)	0	100 (3/3)	50(150/3)
8	100 (8/8)	54,12 (433/8)		100 (8/8)	54,25(434/8)

Nos meios 7 e 8 surgiram os primeiros calos, de coloração parda ou branca, de consistência friável ou compacta, e calos verdes compactos, na presença de luz e no escuro. O número de calos aumentou no decorrer de 60 dias. Depois de 30 dias nos meios 9 e 0, os explantes foram novamente avaliados. Foi observado calos de cores e consistência já citadas, exceto calos verdes, e ainda calos pardos escuros e calos amarelados. O número de calos pode ter aumentado, não havendo uma grande diferença entre os meios 9 e 0, mas a união de alguns calos pode ter "mascarado" o resultado (ver, tabela 6). Após o subcultivo dos calos dos meios 9 e 0 para o meio 11, na presença de luz, os calos verdes puderam ser observados novamente e enquanto eles permaneceram nesse meio a formação de calos continuou (226 calos verdes).

Os mesmos explantes quando transferidos para o meio 12 (BA 0,9 μM e 2iP 2,5 μM e ANA a 1,1 μM), na presença de luz, apresentaram um número menor de calos verdes (151).

Nos experimentos 3.2.1 e 3.2.2, apesar das diferenças na taxa de calogênese, já que no experimento 3.2.1 a taxa de calogênese não foi alta, como no experimento 3.2.2, também existiu uma semelhança nos resultados, pois nos dois

experimentos pode-se observar a presença de calos pardos, brancos e verdes. No experimento 3.2.2 em condições de escuridão, foi detectado o desaparecimento de calos verdes somente na presença de luz, nos meios 0 e 9 (TDZ 0,09 μM e 2,4-D 2,3 μM) e reaparecimento de novos calos verdes a partir de calos pardos ou do limbo foliar.

Experimento 3.2.3

A percentagem de explantes com calos e a taxa de calogênese, foram menores se compararmos os resultados deste experimento (tabela 7) com os dos experimentos 3.2.1 e 3.2.2 (ver tabelas 5 e 6 e apêndice, tabela 6). Entretanto existiu uma semelhança nos resultados, pois nos três experimentos pudemos observar a presença de calos pardos, brancos e verdes.

No entanto no experimento 3.2.3, ao contrário dos experimentos 3.2.1 e 3.2.2, observou-se uma aumento do número de calos nos meios 0 e 9 (TDZ 0,09 μM e 2,4-D 2,3 μM) e em nenhum dos dois meios utilizados houve o aparecimento de calos verdes.

A percentagem de explantes com calos e o número de calos menor pode ser devido à mudança de estação de outono para inverno, pois a diferença de idade de poucos meses nos explantes de plantas da casa de vegetação não mostrou grande interferência nos resultados, isso está demonstrado nos experimentos 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3 a seguir.

TABELA 7 - FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE PLANTA DE CASA DE VEGETAÇÃO, MANTIDOS NO ESCURO

Avaliação	MEIOS DE CULTURA	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)
30 dias	7	88 (8/9)	12,87(103/8)
	8	54 (7/13)	4,71(33/7)
60 dias	7	100 (9/9)	27,90(251/9)
	8	55 (5/9)	13,2(66/5)

Nos meios 0 e 9, observou-se um aumento no nº de calos das mesmas colorações: brancos ou pardos, e consistências friáveis e compactas, as quais foram observadas também nos meios 7 (TDZ 0,18 e 2,4-D 9,1 μM) e 8 (TDZ 0,27 e 2,4-D

4,5 μM). Entretanto o meio sem reguladores do crescimento (0) induziu um maior número de calos que o meio 9, com TDZ e 2,4-D (tabela 7 e 8).

Nesses explantes, quando transferidos ao meio 11 (BA a 0,88 μM combinado a 2iP 2,5 μM e a ANA 5,4 μM), também pode ser observado um aumento no número de calos, já a coloração dos calos e a consistência permaneceram as mesmas. Não foi observada a formação de gemas nem de raízes nesses calos.

TABELA 8 - FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE PLANTA DE CASA DE VEGETAÇÃO, PROVENIENTES DOS MEIOS 7 E 8, MANTIDOS NO ESCURO

AVALIAÇÃO	MEIOS	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)
Antes do subcultivo nos meios 7 e 8	0	62 (5/8)	33,60(168/5)
	9	63 (7/11)	26,43(185/7)
30 dias após o subcultivo	0	100 (6/6)	52,83(317/6)
	9	100 (7/7)	28,14(197/7)

Em conclusão, nos experimentos 3.2.1 a 3.2.3, observamos que a concentração de TDZ 0,18 μM combinada com 2,4-D 9,1 μM (meio 7), na presença e ausência de luz, provocou a formação de calos na maioria dos explantes ver N1 e N2 tabelas 5 e 7, assim como altas taxas de calogênese (tabela 9).

TABELA 9- RESUMO DOS RESULTADOS DOS EFEITOS DE COMBINAÇÕES DE TDZ E 2,4-D (μM) NA FORMAÇÃO DE CALOS EM FRAGMENTOS FOLIARES DE PLANTA CULTIVADA NO TELADO, DEPOIS DE 30 DIAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LUZ

A. Percentagem de explantes com calos

MEIOS	EXPERIMENTO 3.2.1	EXP. 3.2.2	EXP. 3.2.3
Claro	7	100	90
	8	100	86
Escuro	7	94	100
	8	80	100

B. Taxa de calogênese

MEIOS		EXPERIMENTO 3.2.1	EXP.3.2.2	EXP. 3.2.3
Claro	7	22,6	29	21
	8	12,8	17,2	11
Escuro	7	27,9	43	12,9
	8	22,3	37,8	7,7

Experimento 3.2.4

Houve formação de calos nos meios 2 (CIN 2,3 μM e ANA 0,54 μM) e 4 (CIN 4,7 μM e ANA 0,54 μM) (ver apêndice, tabela 7), diferindo um pouco do experimento 3.1.1(explantes de folhas *in vitro*), pois neste apareceram calos nos meios 3 (CIN 4,7 μM e ANA 0,11 μM), 4 e 6 (CIN 9,3 μM e ANA 0,54 μM). Logo no meio 4 houve calogênese nos dois experimentos (explantes de folhas *in vitro* e da casa de vegetação). As concentrações e combinações de CIN e ANA do meio 3 induziram a calogênese somente no experimento 3.1.1.

Nos experimentos 3.1.2 (explantes folhas *in vitro*) e 3.2.1 (explantes foliares de casa de vegetação), houve formação de calos apenas nos meios 2 e 5 (CIN 9,3 μM e ANA 0,11 μM) e 2 e 4, respectivamente, o que mostra que o meio 2 (CIN 2,3 μM e ANA 0,54 μM) pode induzir a calogênese nos explantes foliares de plantas mantidas em condições diferentes. Nos experimentos 3.1.1 e 3.2.1, houve também a formação de calos no meio 4.

No meio 11(BA 0,88 μM , 2IP 2,5 μM e ANA 5,4 μM) foi observado um aumento do número de calos.

Experimento 3.2.5

A calogênese foi observada nos meios 2 (CIN 2,3 μM e ANA 0,54 μM), 4 (CIN 4,7 μM e ANA 0,54 μM) e 6 (CIN 9,3 μM e ANA 0,54 μM) (ver apêndice, tabela 8), porém o número de calos, comparado com o número obtido nos outros experimentos utilizando folhas, foi o menor observado após 30 dias, com 2 calos nos meios 2 e 4 e 3 calos no meio 6. Entretanto, a presença de calos somente nesses meios confirmou o resultado do experimento 3.2.4.

Experimento 3.2.6

Os explantes avaliados após 30 dias, demonstraram formação de calos apenas nos meios 2, 4 e 6 (ver apêndice, tabela 9). Esse resultado foi igual a do experimento 3.2.5

Comparando os experimentos 3.2.4, 3.2.5 e 3.2.6 (ver tabela 10), foram observados os mesmos resultados, mesmo havendo alguma diferença de idade das plantas e de tempo entre os experimentos. Esses resultados demonstraram que a concentração de ANA a 0,11 μM não induziu a formação de calos.

TABELA 10 - RESUMO DO EFEITO DE COMBINAÇÕES DE CIN E ANA NA FORMAÇÃO DE CALOS, NA AUSÊNCIA DE LUZ POR 30 DIAS, EM EXPLANTES FOLIARES RETIRADOS DE PLANTAS CULTIVADAS NA CASA DE VEGETAÇÃO.

A) Percentagem de explantes com calos

CONCENTRAÇÃO (μM)		EXPERIMENTO		
CIN	ANA	3.3.1	3.3.2	3.3.3
2,3	0,11	0	0	0
2,3	0,54	6,3	13	15
4,7	0,11	0	0	0
4,7	0,54	38	10	15
9,3	0,11	0	0	0
9,3	0,54	N.D. ⁽¹⁾	5	40

(1) não determinado

B) Taxa de calogênese

CONCENTRAÇÃO (μM)		EXPERIMENTO		
CIN	ANA	3.3.1	3.3.2	3.3.3
2,3	0,11	0	0	0
2,3	0,54	5	1	3
4,7	0,11	0	0	0
4,7	0,54	2,3	1	1,3
9,3	0,11	0	0	0
9,3	0,54	N.D.	3	2,5

As maiores taxas de calogênese e percentagens de explantes com calos, foram obtidas em meios de cultura diferentes, pois uma maior taxa de calogênese em determinado meio não correspondeu a uma maior percentagem de explantes com calos nesse mesmo meio. Isso indica que não houve correlação entre esses dois fatores.

As combinações de CIN (2,3 μM e 9,3 μM) e ANA (0,54 μM) (meios 2 e 6), foram capazes da indução das maiores taxas de calogênese, porém as maiores percentagens de explantes com calos foram obtidas nos meios 4 e 6, isso demonstra que fatores não determinados influem de modo diferente nessas variantes. Entretanto, no experimento 3.2, os resultados obtidos demonstraram que para os explantes de planta de casa de vegetação nos meios 7 (TDZ 0,18 e 2,4-D 9,1 μM) e 8 (TDZ 0,27 e 2,4-D 4,5 μM), tanto a taxa de calogênese quanto a percentagem de explantes com calos foram elevadas.

Em todos os experimentos com folhas, a origem dos calos foi a mesma, a partir das bordas do limbo foliar, das nervuras central e laterais e em diferentes regiões do limbo, porém um maior número cerca de 80% dos calos foi originado das nervuras centrais, laterais e das bordas do limbo.

Nos experimentos com plantas de casa de vegetação nos meios 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, não foram observadas a formação de raízes. Entretanto, os explantes retirados dos meios 1 (CIN 2,3 e ANA 0,11 μM), 2 (CIN 2,3 e ANA 0,54 μM), 5 (CIN 9,3 e ANA 0,11 μM), 6 (CIN 0,3 e ANA 0,54 μM) e transferidos para o meio 11 (BA 0,88, 2IP 2,5 e ANA 5,4 μM), originaram raízes a partir do limbo foliar após trinta dias. Após um período de 60 dias, os explantes foram repicados para o meio 19 (TDZ 0,3 e ANA 5,4 μM). O número de raízes aumentou, nos explantes retirados dos meios 2, 4 (CIN 4,7 e ANA 0,54 μM) e 6.

4.3 EXPERIMENTO 3.3: EXPLANTES RAÍZES SECUNDÁRIAS DE PLANTAS CRESCIDAS *IN VITRO*, COM 150 DIAS, NOS MEIOS COM CIN E ANA

Experimento 3.3.1

Os explantes permaneceram no escuro nos meios: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 por 30 dias e não demonstraram nenhum tipo de resposta. Esses explantes foram repicados para os mesmos meios e depois de mais 30 dias, no claro, observou-se a presença de poucos (5) calos, apenas no meio 2 (CIN 2,3 μ Me ANA 0,54 μ M).

Os explantes foram analisados novamente com 90 dias, nos meios já citados, e o resultado, considerando o número de calos, foi o mesmo.

Experimento 3.3.2

Os explantes permaneceram uma semana no escuro e depois foram transferidos para a luz. Após 30 dias foram avaliados e não demonstraram nenhuma resposta. Depois de mais 30 dias o resultado continuou o mesmo.

4.4 EXPERIMENTO 3.4.: EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS GERMINADAS *IN VITRO* NOS MEIOS COM BA E ANA

Experimento 3.4.1

A maioria dos calos formados eram brancos, de consistência compacta, com a parte externa friável, originados das bordas e nervuras dos explantes. Nos meios 1.1 (BA 2,2 e ANA 0,11 μM) e 3.3 (BA 4,4 e ANA 0,54 μM) foram encontradas as maiores taxas de calogênese (tabela 11).

TABELA 11 - EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO (μM) NA CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS *IN VITRO*, MANTIDOS NO ESCURO, OBSERVADA APÓS 30 DIAS. EXPERIMENTO 3.4.1.

BA	ANA	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)	Nº DE EXPLANTES COM CALOS UNIDOS EM TODAS AS BORDAS	Nº DE EXPLANTES COM CALOS UNIDOS NA NERVURA CENTRAL
0	0	0	0	0	0
2,2	0,11	55 (11/20)	49 (538/11)	4	2
2,2	0,54	95 (19/20)	31 (581/19)	5	0
4,4	0,11	75 (15/20)	49 (735/15)	7	0
4,4	0,54	94 (16/17)	30 (475/16)	3	2
8,9	0,11	90 (18/20)	23 (405/18)	2	2
8,9	0,54	100 (20/20)	32 (631/20)	5	2

NOTA: A "massa" de calos (calos unidos) foi estimada em 100 calos por explante, quando todas as bordas possuem calos e em 25 calos, quando a nervura central estava preenchida por uma "massa" de calos. Essa estimativa foi feita devido à impossibilidade dos calos serem contados, pois estavam unidos formando uma "massa" de calos.

Os explantes repicados para os meios 0 e 12 (BA 0,88 μM , 2IP 2,5 e ANA 1,1 μM), após 30 e 60 dias, demonstraram apenas o resultado obtido anteriormente, ou seja a formação de calos.

Experimento 3.4.2

Os resultados da calogênese foram diferentes, quando comparados aos do experimento 3.4.1, pois as maiores taxas de calogênese foram nos meios contendo BA a 4,4 e ANA 0,54 μM , BA 8,9 μM e ANA 0,11 μM ou 0,54 μM de ANA. Isso pode ser devido a diferença de idade das plantas das quais os explantes foram retirados (tabela 12).

TABELA 12 - EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO (μM) NA CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS *IN VITRO*, MANTIDOS NO ESCURO, OBSERVADA APÓS 30 DIAS. EXPERIMENTO 3.4.2.

BA	ANA	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)	Nº DE EXPLANTES COM CALOS UNIDOS EM TODAS AS BORDAS	Nº DE EXPLANTES COM CALOS UNIDOS NA NERVURA CENTRAL
0	0	0	0	0	0
2,2	0,11	100 (20/20)	13 (262/20)	0	1
2,2	0,54	95 (19/20)	17 (329/19)	3	1
4,4	0,11	85 (17/20)	25 (427/17)	1	6
4,4	0,54	90 (20/22)	32,4 (649/20)	5	1
8,9	0,11	80 (16/20)	39 (616/16)	4	3
8,9	0,54	85 (17/20)	33 (563/17)	2	4

Os explantes retirados dos meios acima citados, permaneceram por 30 dias no meio 15 (CIN 1,2 μM e ANA 2,7 μM). Foi observada a formação de calos e raízes.

No meio 15, os explantes retirados dos meios 2.2 e 4.4 (BA 2,2 μM e 4,4 μM combinada com 0,54 μM de ANA) demonstraram os maiores números de raízes, as quais se originaram de calos ou diretamente do limbo foliar (tabela 13).

TABELA 13 - FORMAÇÃO DE RAÍZES EM EXPLANTES RETIRADOS DOS MEIOS 1.1 A 6.6, OBSERVADOS APÓS 30 E 60 DIAS NO MEIO 15, NA AUSÊNCIA DE LUZ

MEIO INICIAL (μM)		TAXA DE RIZOGÊNESE (Nº DE RAÍZES/Nº DE EXPLANTES COM RAÍZES)	
BA	ANA	APÓS 30 DIAS	APÓS 60 DIAS
2,2	0,11	2,7 (30/11)	3,9 (70/18)
2,2	0,54	3,1 (43/14)	5 (74/15)
4,4	0,11	4,4 (22/5)	5,5 (44/8)
4,4	0,54	4,3 (69/16)	4,4 (71/16)
8,9	0,11	4,0 (24/6)	4,5 (45/10)
8,9	0,54	0	1,3 (4/3)

Experimento 3.4.3

Nesse experimento como nos dois anteriores uma das maiores taxa de calogênese foi no meio 6.6 (ver apêndice, tabela 10), embora a percentagem de explantes com calos não seja a maior. Os outros meios com maiores taxas de calogênese foram o meio 5.5, como no experimento 3.4.2, e o meio 2.2, diferindo dos outros experimentos.

Os meios 2.2 e 6.6, com concentrações de BA 2,2 μM e 8,9 μM combinadas com ANA a 0,54 μM induziram as maiores percentagens de explantes com calos e o meio 6.6, também, as maiores taxas de calogênese.

As maiores taxas de calogênese no experimento 3.4.1, foram obtidas nos meios 1.1, 3.3, 6.6, já no experimento 3.4.2 estas foram nos meios 4.4, 5.5, 6.6 e no experimento 4.4.3 nos meios 2.2, 5.5 e 6.6 (tabela 14). Essa divergência de resultados foi devida à fatores não determinados, pois a idade dos explantes nos dois últimos experimentos é aproximadamente a mesma, e as condições também, logo, os resultados deveriam ser confirmados.

TABELA 14 - EFEITO DE COMBINAÇÕES DE BA E ANA NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS CULTIVADAS *IN VITRO*, DEPOIS DE 30 DIAS NA AUSÊNCIA DE LUZ

A) Percentagem de explantes com calos

CONCENTRAÇÃO (μM)		EXPERIMENTO		
BA	ANA	3.4.1	3.4.2	3.4.3
2,2	0,11	55	100	75
2,2	0,54	95	95	100
4,4	0,11	75	85	100
4,4	0,54	94	90	84
8,9	0,11	90	80	85
8,9	0,54	100	85	95

B) Taxa de calogênese

CONCENTRAÇÃO (μM)		EXPERIMENTO		
BA	ANA	3.4.1	3.4.2	3.4.3
2,2	0,11	49	13	5,3
2,2	0,54	31	17	10
4,4	0,11	49	25	8,6
4,4	0,54	30	32	8
8,9	0,11	23	39	16
8,9	0,54	32	33	16

Os explantes foram transferidos para o meio 16 (CIN 1,6 e ANA 5,4 μM) e depois de 30 dias foram avaliados. Além da calogênese presente nos outros meios, houve também a formação de raízes (ver Figura 4 e tabela 15).

TABELA 15 - FORMAÇÃO DE RAÍZES NOS EXPLANTES RETIRADOS DOS MEIOS 1.1 A 6.6, OBSERVADOS APÓS 30 E 60 DIAS, NO MEIO 16

MEIO INICIAL		TAXA DE RIZOGÊNESE (N° DE RAÍZES/N° DE EXPLANTES COM RAÍZES)		
BA (μM)	ANA (μM)	APÓS 30 DIAS	APÓS 60 DIAS	
			ESCURO	CLARO
2,2	0,11	1,0 (3/3)	2,6 (21/8)	0
2,2	0,54	1,8 (18/10)	5,2 (52/10)	1,7 (7/4)
4,4	0,11	1,7 (12/7)	5,5 (33/6)	1,3 (4/3)
4,4	0,54	3,4 (17/5)	3,5 (21/6)	3,0 (9/3)
8,9	0,11	1,6 (5/3)	2,4 (19/8)	1,2 (7/6)
8,9	0,54	1,0 (3/3)	1,2 (6/5)	1,0 (1/1)

Os explantes retirados dos meios 2.2 e 4.4, após 30 dias no meio 16, originaram o maior número de raízes, como no experimento 3.4.2. Esses explantes

permaneceram no mesmo meio, porém a metade foi colocada na presença de luz e a outra permaneceu na ausência. Decorridos 30 dias, os explantes foram avaliados. Os resultados obtidos, ver tabela 15, e a observação das raízes mostram que a luz provoca a oxidação e diminui a indução de novas raízes.

4.5 EXPERIMENTO 3.5: EXPLANTES FOLIARES, GERALMENTE TERCEIRA E QUARTA FOLHAS, DE PLANTAS DA CASA DE VEGETAÇÃO

Experimento 3.5.1

Após 30 dias, foi observada a presença de calos em todos os meios com exceção do meio 0, a maioria dos calos sendo de coloração branca, de consistência compacta com a parte externa friável e se originaram das nervuras, existiram também calos amarelados compactos (ver Figura 1). A maior taxa de calogênese foi no meio 1.1 (BA 2,2 e ANA 0,11 μM) (ver apêndice, tabela 11 e tabela 16).

Após um período de 60 dias, os explantes foram transferidos para o meio 12 (BA 0,88, 2IP 2,5 e ANA 1,1 μM), no qual permaneceram por 30 dias e não demonstraram nenhuma resposta além da calogênese como no experimento 3.4.1. Os explantes foram avaliados novamente após 60 dias e foi observada apenas a presença de três raízes em três explantes.

Comparando os experimentos 3.4.1 e 3.5.1, nos quais foram utilizados explantes foliares de origens diferentes, podem ser observadas congruências nos resultados como a maior taxa de calogênese no meio 1.1 e divergências como as obtidas nos meios 3.3 (BA 4,4 e ANA 0,11 μM) e 4.4 (BA 4,4 e ANA 0,54 μM). Independente do tipo de explante, a segunda maior taxa foi, no experimento 3.4.1, no meio 3.3 e, no experimento 3.5.1, no meio 4.4.

Experimento 3.5.2

Decorridos de 30 dias, a maioria dos explantes estavam oxidados, 82 explantes oxidados de 140. Isso pode ter interferido no resultado, porém os calos foram observados em alguns explantes oxidados (ver tabelas 16 e 17).

Após 60 dias, os explantes foram transferidos para o meio 15 (CIN 1,6 e ANA a 2,7 μM), no qual após 30 dias, os explantes não demonstraram nenhuma resposta além da calogênese.

TABELA 16 - FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES, DE PLANTA DO TELADO, APÓS 30 DIAS NO ESCURO

BA (μM)	ANA (μM)	% de explantes com calos (N1/N2)	Taxa de calogênese
0	0	0	0
2,2	0,11	8 (1/13)	3 (3/1)
2,2	0,54	12,5 (2/16)	1 (2/2)
4,4	0,11	0 (0/17)	0 (0/0)
4,4	0,54	23 (3/13)	18 (53/3)
8,9	0,11	15 (3/20)	25 (75/3)
8,9	0,54	20 (2/10)	13 (26/2)

Experimento 3.5.3

O número de calos foi pequeno , 6 calos, e em alguns meios não houve calogênese (ver apêndice, tabela 12 e tabela 17), porém as maiores taxas foram nos meios 1.1, 4.4, como no experimentos 3.5.1 e nos meios 4.4 e 5.5 como no experimento 3.5.2.

Com 60 dias os explantes, que estavam nos meios 1.1, 2.2, 3.3, 4.4, 5.5 e 6.6, foram transferidos para o meio 16 (CIN 1,6 μM e ANA 5,4 μM), como no experimento 3.4.3 e após 30 dias avaliados, o resultado foi a presença de raízes apenas nos explantes retirados dos meios 1.1, uma raiz, e 4.4, 2 raízes.

Comparando os experimentos 3.5.1, 3.5.2 e 3.5.3 foi observada que no meio 4.4 (BA 4,4 μM e ANA 0,54 μM) uma das maiores taxas de calogênese, embora nesse mesmo meio só foi observada a maior percentagem de explantes com calos, no experimento 3.5.2. Logo, houveram poucas diferenças entre os resultados dos três experimentos, entretanto quando comparados com os experimentos 3.4.1, 3.4.2 e 3.4.3, os resultados foram diferentes. Isso pode ser devido ao tipo de material, ou seja, à origem dos explantes .

As maiores percentagens de explantes com calos foram obtidas nas combinações de BA 2,2 e 8,9 μM combinadas, respectivamente, com ANA a 0,54 μM e 0,11 μM (meios 2.2 e 5.5). Já as maiores taxas de calogênese foram observadas nos explantes em meios 4.4 e 5.5, com concentrações de BA a 4,4 e 8,9 μM , combinadas, respectivamente, com ANA a 0,54 e 0,11 μM (ver tabela 17).

TABELA 17 - EFEITO DE COMBINAÇÕES DE BA E ANA NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE PLANTA DO TELADO, CULTIVADOS POR 30 DIAS NO ESCURO

A) Percentagem de explantes com calos

CONCENTRAÇÃO (μM)		EXPERIMENTO		
BA	ANA	3.5.1	3.5.2	3.5.3
2,2	0,11	55	8	4
2,2	0,54	70	13	0
4,4	0,11	20	0	0
4,4	0,54	33	23	3
8,9	0,11	80	15	2,5
8,9	0,54	35	20	0

B) Taxa de calogênese

CONCENTRAÇÃO (μM)		EXPERIMENTO		
BA	ANA	3.5.1	3.5.2	3.5.3
2,2	0,11	6	3	3
2,2	0,54	3,3	1	0
4,4	0,11	2	0	0
4,4	0,54	4,6	16	2
8,9	0,11	2,3	25	1
8,9	0,54	3,4	13	0

4.6 EXPERIMENTO 3.6.1: EXPLANTES RAÍZES SECUNDÁRIAS DE PLANTAS CRESCIDAS *IN VITRO* NOS MEIOS COM BA E ANA

Experimento 3.6.1

A maior taxa de calogênese foi no meio 1.1 (BA 2,2 μM e ANA 0,11 μM , as taxas dos outros meios foram parecidas (ver apêndice, tabela 13).

Depois de um período de 60 dias os explantes foram repicados para os meios 15 (CIN 1,2 μM e ANA 1,1 μM) e 16 (CIN 1,2 μM e ANA 5,4 μM). Avaliados após 60 dias, no meio 15, além da calogênese foi observada a presença de raízes nos explantes retirados dos meios 1.1 (5 raízes em 2 explantes de um total de 40 explantes) e 2.2 (3 raízes em 2 explantes de 40 explantes) e uma raiz em um total de 40 explantes, no explante retirado no meio 2.2 (BA 2,2 e ANA 0,54 μM), no meio 16.

Experimento 3.6.2

Foi observada ausência de calos nos meios 0, 1.1 e 6.6 (BA 8,8 $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$ e ANA 0,54 μM) (ver apêndice, tabela 14).

Quando os explantes foram transferidos e permaneceram no meio 16, decorridos 30 e 60 dias, resultou em apenas calogênese (ver Figura 3).

Experimento 3.6.3

A maior taxa de calogênese foi no meio 6.6, contrariando os dois experimentos anteriores, nos quais a taxa foi zero (ver apêndice, tabela 15).

Os explantes foram repicados para o meio 15 (CIN 1,2 e ANA 1,1 $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$), no qual permaneceram por 60 dias, então foram avaliados, o resultado foi apenas a calogênese e o aumento do volume de alguns calos, que foram retirados de determinados meios.

Nos experimentos 3.6.1, 3.6.2 e 3.6.3 comparando percentagem de explantes com calos e a taxa de calogênese, foi verificada uma diferença de resultados entre os experimentos. Entretanto as percentagens de explantes com calos, foram

maiores nas combinações de BA 2,2 e 4,4 μM , combinadas com ANA a 0,54 μM (meios 2.2 e 4.4). E as maiores taxas de calogênese foram na concentração de ANA a 0,54 μL^{-1} , quando combinada a 4,4 e 8,8 μM de BA (meios 4.4 e 6.6) (ver tabela 18).

TABELA 18 - EFEITO DE COMBINAÇÕES DE BA E ANA NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES DE RAÍZES, CULTIVADAS POR 30 DIAS NA AUSÊNCIA DE LUZ

A) Percentagem de explantes com calos

CONCENTRAÇÃO (μM)		EXPERIMENTO		
BA	ANA	3.6.1	3.6.2	3.6.3
2,2	0,11	10	0	12,5
2,2	0,54	55	5	10
4,4	0,11	18	2	5
4,4	0,54	28	2	20
8,9	0,11	2	2	10
8,9	0,54	0	0	5

B) Taxas de calogênese

CONCENTRAÇÃO (μM)		EXPERIMENTO		
BA	ANA	3.6.1	3.6.2	3.6.3
2,2	0,11	1,8	0	1,3
2,2	0,54	1,5	1	1,5
4,4	0,11	1,6	1	1
4,4	0,54	1,6	2	5
8,9	0,11	1	1	1,3
8,9	0,54	0	0	13,5

5 DISCUSSÃO

5.1 Explantes foliares de plantas mantidas na casa de vegetação

A) Reguladores de crescimento CIN e ANA

Combinações desses fitoreguladores presentes no meios 2 (CIN 2,3 e ANA 0,54 μM), 4 (CIN 4,6 e ANA 0,54 μM) e 6 (CIN 9,3 e ANA 0,54 μM), mostraram-se capazes de induzir a calogênese, a qual foi avaliada pelas percentagens de explantes com calos e taxas de calogênese. Esses dois parâmetros comportaram-se de forma independente, ou seja, as combinações dos dois reguladores que induziram as maiores taxas de calogênese, nesses explantes, foram CIN 2,3 e 9,3 μM combinadas a ANA 0,54 μM . Essas não foram capazes de induzir as maiores percentagens de explantes com calos, a qual foi CIN 4,7 e ANA 0,54 μM . Através do teste do Qui-quadrado foi confirmado que os meios induzem a calogênese com intensidades diferentes. O melhor meio para indução de calos foi o meio com CIN 9,3 μM e ANA 0,54 μM (ver apêndice, Qui-quadrado 3).

Os explantes do experimento 3.2.6, depois da permanência nos meios 1, 2, 4, 5, 6 na ausência de luz, foram para o meio 11 (BA 0,88 μM , 2iP 2,5 μM e ANA 5,4 μM) e decorridos 30 dias foram observadas 18 raízes em 7 explantes, de um total de 40. Quando esses explantes foram transferidos no meio 19 (BA 0,26 e ANA 5,4 μM), o número de raízes aumentou, as quais tiveram origem a partir do limbo dos explantes retirados dos meios 2, 4, 6 (CIN 2,3 μM , 4,7 e 9,3 μM combinadas respectivamente com 0,54 μM de ANA) e 1, 5 (CIN 2,3 e 9,3 μM , combinadas com ANA a 0,11 μM).

B) Reguladores de crescimento TDZ e 2,4-D

Os resultados de calogênese obtidos com esses fitoreguladores na presença e ausência de luz, foram melhores que aqueles obtidos com CIN e ANA.

Os dois reguladores de crescimento demonstraram diferenças na indução de calos em função da presença ou não de luz, sendo o fato confirmado pelo teste do Qui-quadrado. Na ausência de luz, conforme os resultados e o teste, as duas concentrações de TDZ 0,18 e 0,27 μM combinadas, respectivamente, com 2,4-D 9,1 e 4,5 μM , foram capazes da indução similar de calos. Já na presença de luz os meios induzem a calogênese com intensidades diferentes e o meio com 0,18 μM de

TDZ e 9,1 μM de 2,4-D proporcionou o maior número, sendo 471 calos (ver apêndice, Qui-quadrado 6, 7 e 8). Porém, na presença de luz e nas duas combinações de fitoreguladores, o maior número de calos foi menor que aquele obtido na ausência de luz, nos mesmos meios.

C) Reguladores de crescimento **BA e ANA**

As maiores percentagens de explantes com calos foram observadas nos meios 2.2 (BA 2,2 e ANA 0,54 μM) e 5.5 (BA 8,8 e ANA 0,11 μM) e as maiores taxas de calogênese nos meios com BA a 4,4 μM e 8,8 μM combinada com ANA a 0,54 μM e 0,11 μM , respectivamente, (meios 4.4 e 5.5). Já o maior número de calos foi observado no meio 5.5, mostrando que as combinações desses fitoreguladores induzem a calogênese de forma distinta. O teste do Qui-quadrado confirmou o resultado observado e também demonstrou que o meio 5.5, com BA 8,8 μM e ANA 0,54 μM , foi o melhor meio na indução de calos dentre os meios 1.1 a 6.6 (ver apêndice, Qui-quadrado 5). Porém, o meio 8 (TDZ 0,27 μM e 2,4-D 4,5 μM), na ausência de luz, foi capaz da maior indução de calos, para explantes foliares de plantas mantidas na casa de vegetação.

5.2 Explantes foliares de plantas cultivadas *in vitro* :

A) Reguladores de crescimento **CIN e ANA**

A combinação de CIN 4,7 e ANA 0,54 μM , utilizando explantes foliares na ausência de luz, induziu a maior percentagem de explantes com calos. As concentrações de CIN 4,7 e 9,3 μM combinadas, respectivamente com ANA 0,54 e 0,11 μM mostraram os melhores resultados na formação de calos. O teste do Qui-quadrado confirmou que essas combinações de CIN ANA induzem a calogênese distintamente e que nas condições citadas o meio com CIN 4,7 e ANA 0,54 μM , no qual existiu a maior diferença entre o observado e o esperado deve ser considerado o melhor meio dentre os com CIN e ANA, para indução de calos (ver apêndice, Qui-quadrado 2).

No experimento 3.1.2, no meio 2 (CIN 2,3 e ANA a 0,54 μM), decorridos 60 dias, os explantes desenvolveram raízes. Já no experimento 3.1.3, após um período de 30 dias, raízes se desenvolveram nos explantes cultivados nos meios com CIN 4,65, ANA 0,11 e 0,54 μM e CIN 9,3 com ANA 0,11 e 0,54 μM . O maior número de raízes foi observado nos meios com CIN 4,7, ANA 0,54 e 0,11 μM . Esta variação nos

resultados pode ser devida à diferença de idade entre as plantas utilizadas nos experimentos (aproximadamente 150 dias).

Na presença desses reguladores, o maior número de calos, quando comparados os dois tipos de explantes foliares (retirados de plantas de casa de vegetação e *in vitro*), foi obtido nos explantes de folhas *in vitro* (ver apêndice, Qui-quadrado 13).

B) Reguladores de crescimento **TDZ e 2,4-D**

Na ausência de luz, as duas concentrações dos reguladores (meios 7 e 8) induziram a calogênese com a mesma intensidade (ver apêndice, Qui-quadrado 1).

Essas combinações, quando comparadas com as de BA e ANA, induziram o menor número de calos por explante. Entretanto quando comparado o número de calos nos explantes de folhas de casa de vegetação e *in vitro*, nas concentrações de TDZ e 2,4-D, os maiores números foram obtidos nos primeiros (ver apêndice, Qui-quadrado 15).

C) Reguladores de crescimento **BA e ANA**

Os meios de cultura contendo BA 2,2 e 8,9 μM combinados com ANA 0,54 μM , induziram a maior percentagem de explantes com calos (100%) e as concentrações de BA 4,4 e 8,9 μM combinadas, respectivamente, com ANA 0,11 e 0,54 μM as maiores taxas de calogênese.

De acordo com o resultado observado e confirmado pelo teste do Qui-quadrado, os meios induziram a formação de calos com intensidades diferentes. O meio com BA 8,9 μM e 0,54 μM de ANA induziu o maior número de calos (ver apêndice, Qui-quadrado 4).

Os explantes do experimento 3.4.2 foram transferidos para o meio 15 (ANA 2,7 e CIN 1,2 μM) e, após 30 dias, foi detectada a presença de raízes e o maior número dessas foi observado nos explantes que haviam sido retirados do meio com BA 4,4 combinada com ANA a 0,54 μM (ver apêndice, Qui-quadrado 10). As raízes tiveram origem de calos ou diretamente do limbo foliar.

Através do teste do Qui-quadrado foi confirmado que os explantes nos meios anteriores ao meio 15 não são iguais para a indução de raízes. Logo, os explantes já há 30 dias no meio 15, não produziram o mesmo número de raízes devido ao efeito dos meios anteriores. Esse fato também foi observado no meio 16 (CIN 1,2 μM e

ANA 5,4 μM), quando explantes do experimento 3.4.3 permaneceram nesse meio. Porém, o número médio de raízes no meio 16 foi menor que no meio 15.

Os resultados obtidos nos meios 15 e 16 mostraram que a menor concentração da auxina ANA foi capaz da maior indução de raízes, para a mesma concentração de CIN (ver apêndice, Qui-quadrados 11 e 12).

Já no experimento 3.4.1, no qual os explantes foliares de plantas crescidas *in vitro* foram transferidos para os meios 0 e 12 (BA 0,88, 2iP 2,5 e ANA 1,1 μM), não foi observada a formação de raízes, apenas a presença de calos. De acordo com esses resultados, não foram as concentrações de BA e ANA dos meios anteriores que induziram a formação de raízes, pois no meio sem reguladores essas não foram originadas. O meio 12 foi incapaz de induzir a formação de raízes, talvez pela concentração de ANA ser baixa e a de citocinina alta.

Comparando os dois tipos de explantes foliares, de acordo com o teste do Qui-quadrado e as observações, os reguladores BA e ANA induziram maior número de calos nos explantes de folhas retiradas de plantas *in vitro* (ver apêndice, Qui-quadrado 14).

5.3 Explantes retirados de raízes de plantas cultivadas *in vitro*

Reguladores de crescimento BA e ANA

O maior número de calos foi obtido no meio 4.4 (BA 4,4 e ANA 0,11 μM), já a maior percentagem de explantes com calos no meio 2.2 (BA 2,2 e ANA 0,54 μM) e as maiores taxas de calogênese nos meios 4.4 e 6.6 (BA 8,9 e ANA 0,54 μM).

O teste do Qui-quadrado confirmou o resultado observado de que diferentes combinações de reguladores de crescimento, induzem a formação de calos em intensidades diferentes e possibilitou a identificação do melhor meio para calogênese: BA 4,4 e ANA 0,54 μM (ver apêndice, Qui-quadrado 9).

Explantes foliares e de raízes de plantas *in vitro* foram utilizados em vários trabalhos de regeneração de gemas, por exemplo no caso da macieira (LIU et al., 1983; MALAVASI & PREDIERI, 1990). A partir de explantes foliares desta espécie, foram obtidos brotos em meio MS com adição de BA 4,4 μM e ANA 5,4 μM assim como no meio RM (meio N6 de CHU, et al., 1975) contendo BA 22,2 μM e IBA 0,49 μM . No presente experimento foi testada apenas uma vez a primeira concentração

de reguladores de crescimento (meio 14), em explantes foliares de plantas cultivadas *in vitro*, porém o resultado foi apenas a formação de calos.

Apesar de terem sido testadas altas concentrações de citocininas comparadas com as concentrações de auxinas (com exceção de alguns meios), como no experimento de MALAVASI & PREDIERI (1990), não foram conseguidos brotos, talvez porque a concentração de CIN não seja tão alta, como no experimento já citado, o qual destacou a importância das citocininas para formação de brotos.

No caso do mogno (*Swietenia macrophylla* King), a obtenção de brotos ainda não foi alcançada. ALBARRÁN et al., 1997, utilizou segmentos foliares e obteve o melhor resultado na formação de calos no meio de MS, com a metade da sua concentração de sais, TDZ 0,09 μM e 2,4-D 22,6 μM . Outros pesquisadores como VENKETESWARAN et al., (1988), usando o meio MS modificado e suplementado com 2,4-D 9,1 μM e 5,4 μM de ANA, também obtiveram calos a partir de folhas e do tecido cotiledonar.

No presente experimento foi também utilizado 2,4-D a 9,1 μM , além de outras concentrações, combinadas com TDZ, diferindo do experimento anterior por não ter sido usados meios somente com auxinas. Apesar disso, os resultados foram semelhantes, pois também foram obtidos calos a partir de folhas de plantas mantidas em duas condições diferentes (*in vitro* e *ex vitro*).

Em outro trabalho utilizando apenas a citocinina BA nas concentrações de 2,2 a 8,8 μM , foi observada a diferenciação em brotos a partir de calos, os quais foram obtidos de flores da *Dallbergia sissoo* (KOSSAIN et al, 1994), porém no presente experimento não foi utilizado meio de cultura somente com citocininas.

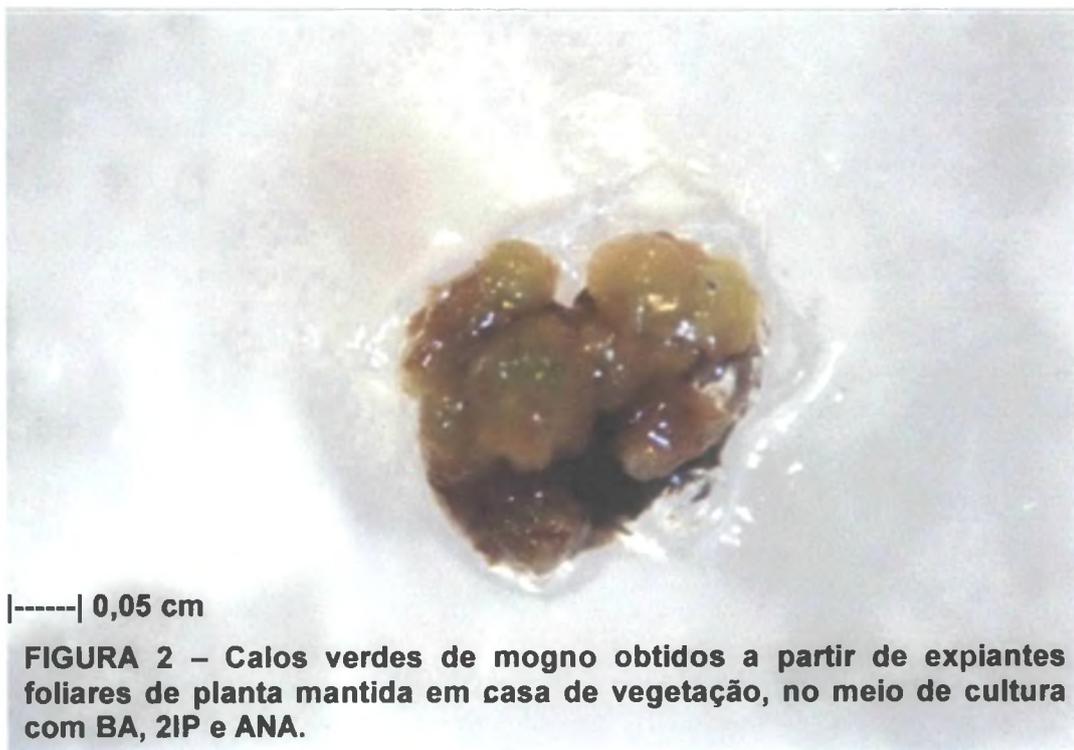
A produção de calos a partir de explantes foliares foi diferente em função da presença ou ausência de luz e, como no trabalho de LIU et al. (1983) com macieira, o maior número de calos foi obtido no escuro.

A obtenção de calos compactos e friáveis, nos explantes foliares de plantas mantidas em casa de vegetação, nos meios de cultura com TDZ e 2,4-D, foi alta, assim como nos explantes foliares de plantas crescidas *in vitro* nos meios de cultura com BA e ANA. Este resultado foi diferente daquele obtido com hipocótilos de *Eucalyptus urophylla* cultivados em meio de cultura MS com TDZ 2,3 μM , que foram capazes da regeneração de brotos a partir de calos compactos (TIBOK et al, 1995).

Em explantes nodais e foliares de *Eucalyptus dunnii*, cultivados em meio MS adicionado de 1/6 da concentração de cálcio e os reguladores BA e ANA em um balanço de 5:1 foram obtidas gemas (JOBIN & TERMIGNONI, 1989). No presente trabalho, o menor balanço de BA e ANA foi 10:1 e foi obtida somente a calogênese.

Em outros trabalhos com exemplares da família Meliaceae, da espécie *Naregamia alata*, brotos foram desenvolvidos diretamente, sem a formação de calos, a partir de explantes foliares em meio MS com BA 4,9 μM e GA₃ 5,8 μM (SHAJI et al., 1997) e também na espécie *Azadirachta indica* em explantes foliares e de raízes em meio MS com BA 8,8 μM e AIA 0,57 μM , foram obtidos brotos (SALVI et al., 2001). Entretanto, no presente trabalho, testando meios com concentrações parecidas de BA 8,8 μM e ANA 0,54 μM , esse resultado não foi alcançado.

No caso da espécie *Azadirachta excelsa*, outra Meliaceae, os calos se desenvolveram no meio de Murashige e Skoog (1962), complementado com IBA 19,6 μM e BA 4,4 μM . Para indução de regeneração de brotos, a concentração de BA foi aumentada para 8,9 μM (GIAGNACOVO et al., 2001).





6 CONCLUSÕES

- ◆ A formação de calo, tecido indiferenciado com baixa determinação e elevada competência para formação de raízes e gemas adventícias, foi obtida nos explantes utilizados. Os maiores números de calos para explantes foliares de plantas da casa de vegetação foram obtidos no meio com TDZ 0,18 μM combinado a 2,4-D 9,1 μM . Já para explantes foliares de plantas mantidas *in vitro*, foram os meios com BA (4,4 μM) e ANA (0,54 μM) e BA (8,9 μM) combinada com ANA (0,11 e 0,54 μM) que induziram os maiores números de calos. Porém o balanço hormonal necessário para o desenvolvimento de gemas não foi encontrado.
- ◆ Raízes foram utilizadas como explantes, pois são órgãos com células competentes (células meristemáticas), as quais poderiam dar origem à organogênese direta. Entretanto, houve apenas uma desdiferenciação do explante e conseqüentemente a formação de calos, esses em pequeno número, 5 calos, na presença da cinetina combinada com ANA. Já na presença de BA 2,2 μM combinada com ANA 0,54 μM foi induzido um dos maiores números, com 33 calos em 22 de 40 explantes.
- ◆ A regeneração de raízes a partir de explantes foliares foi observada e o maior número de raízes foi induzido em explantes de plantas *in vitro*, em meios de culturas com CIN 1,2 μM combinada a ANA 2,7 e 5,4 μM , com uma média de 4 raízes por explante em, respectivamente, 5 e 16 explantes de um total de 20 explantes em cada meio, os quais foram retirados do meio anterior com BA 4,4 μM e ANA 0,54 μM .
- ◆ A presença de luz, a qual já se sabe pode resultar em efeitos na morfogênese e na velocidade de obtenção de folhas nas plantas, no presente experimento foi utilizada como uma variante (ausência e presença de luz) e os melhores resultados em termos de calogênese foram observados na sua ausência.
- ◆ Sugerimos, para possível obtenção de gemas adventícias, testar meios de cultura contendo somente citocininas e/ou meios com combinações de citocininas e auxinas (CK/AUX) em uma relação maior que 100.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARRÁN, J. G.; VIELMA, M.; CONTRERAS, I. G. Cultivo *in vitro* da *Swietenia macrophylla* King.: Estudio de condiciones óptimas para la regeneración y transformación genética. **Rev. Forest. Venez.**, v. 41, n. 2, p. 111-118, 1997.

AMARAL, L. G. **Flora do Estado de Goiás: Meliaceae**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás Coleção Rizzo, 1981.

BRASIL. Decreto-lei 7951 de 23 de janeiro de 1992. Relaciona oficialmente as flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário oficial** da República Federativa do Brasil. Brasília, p. 870-872, Seção 1.

CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y.; BIN, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experimentation on nitrogen sources. **Scientia Sinic**, [S.I], v. 18, p. 659-668, 1975.

FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M. E. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981, p. 327.

GIAGNACOVO, G.; PASQUA, G.; MONACELLI, B.; VAN, S. A.; MACCIONI, O.; VITALI, F. Organogenesis and embryogenesis from callus cultures of *Azadirachta excelsa*. **Plant-biosystems**, [S.I], v.135, n. 1, p.13-18, 2001.

HOSSAIN, M.; HANUS, D.; KEVERS, C.; GASPAR, T. In vitro multiplication of the forest tree *Dalbergia sisso* Roxb. **Saussurea**: Société Botanique de Genève, v. 25, p. 69-73, 1994.

JANZEN, D. H. Managements of habitat fragments in a tropical dry forest: Growth. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 105-116, 1988.

LAMPRECHT, H. **Silvicultura nos trópicos: ecossistemas florestais e respectivas espécies arbóreas-** possibilidades e métodos de aproveitamento sustentado. Eschbom: Rossdorf, p. 308-310, 1990.

LEMOS FILHO, J. P.; DUARTE, R. J. Germinação e longevidade das sementes de *Swietenia macrophylla* King - Mogno (Meliaceae). Viçosa: **Sociedade de Investigações Florestais**, v. 25, n. 1, p. 125-130, 2001.

LIU, J. R.; SINK, K. C.; DENNIS, F. G. Plant regeneration from apple seedling explants and callus cultures. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, [S.I], v. 2, p. 293-304, 1983.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa. SP: ed. Plantarum, v. 1, p. 243, 1996.

MALAVASI, F. F. F.; PREDIERI, S. Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. **Acta Horticulturae**, [S.I], v. 280, p. 61-65, 1990.

MARRERO, J. A seed study of some tropical hardwoods. **Caribbean Forester**, v. 4, p.99, 1943.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.**, [S.I], v.15, p. 473-497, 1962.

PROPAGAÇÃO vegetativa em *Eucalyptus dunnii*: micropropagação e organogênese. Rio Grande do Sul: IV Semana do Instituto de Biociências, 1989. JOBIM, C.; TERMIGNONI, R.

SALVI, D. N.; SINGH, H.; TIVAREKAR, S.; EAPEN, S. Plant regeneration from different explants of neem. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, [S.I], v. 65, n. 2, p.159-162, 2001.

SHAJI, J; SONIYA, E. V.; VALSALA, K.; NAIR, G. M. In vitro adventitious shoot formation from mature leaves and leaf derived calli of *Naregamia alata* W and A. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, n. 11, p.1249-1251, nov.,1997.

TIBOK, A.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, Ireland, v. 110, p. 139-145, 1995.

TORRES, A. C.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S. **Cultura de tecido e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: Embrapa -SPI/ Embrapa CNPH, p. 185-194, 1998.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. de M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 11, 25, 44, 49 e 107, 2000.

VENKETESWARAN, S.; DIAS, M.; SULTANBAWA, F.; WEYERS, U. V. Tissue culture studies on mahogany tree, *Swietenia*. London: Kluwer Academic Publishers. **Somatic Cell Genetics of Wood Plants**, [S.I], p. 147- 153, 1988.

VERÍSSIMO, A; BARRETO, P.; TARIFA, R.; UHL, C. Extraction of a high-value natural resource in Amazonia: the case of mahogany. **Forest Ecology and Management**, Amsterdã, v. 72, n. 1, p. 39-60, 1995.

YAMAZAKI, S.; IKEDA, T.; TAKETANI, A.; PACHECO, C. V.; SATO, T. Attack by the mahogami soot borer *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), on the meliaceous trees in the Peruvian Amazon. **Appl. Ent. Zool.**, v. 27, p. 31-38, 1992.

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1-	TABELAS 2, 3 E 4 EXPLANTES FOLHAS <i>IN VITRO</i>	48
APÊNDICE 2-	TABELAS 6, 7, 8 E 9 – EXPLANTES FOLHAS DE PLANTAS DA CASA DE VEGETAÇÃO.....	49
APÊNDICE 3-	TABELA 10 – EXPLANTES FOLHAS <i>IN VITRO</i> E TABELAS 11 E 12 – EXPLANTES FOLHAS DE PLANTAS DA CASA DE VEGETAÇÃO.....	50
APÊNDICE 4-	TABELAS 13, 14, E 15 - EXPLANTES RAÍZES <i>IN VITRO</i>	51
APÊNDICE 5-	TESTES QUI-QUADRADO.....	52

APÊNDICE 1-

EXPLANTES DE FOLHAS GERMINADAS *IN VITRO*

TABELA 2 - CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES, MANTIDOS NO ESCURO, OBSERVADA APÓS 30 DIAS

MEIOS	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)
3	18,75 (3/16)	2,3 (7/3)
4	25 (4/16)	2 (8/4)
6	25 (4/16)	2 (8/4)

TABELA 3 - CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES, MANTIDOS NO ESCURO, OBSERVADA APÓS 30 DIAS.

MEIOS	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)
2	25 (5/20)	1,25 (5/4)
5	6 (1/15)	1 (1/1)

TABELA 4 - CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES, MANTIDOS NO ESCURO, OBSERVADA APÓS 30 DIAS.

MEIOS	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE N3/N1)
1	10 (2/20)	1,5 (3/2)
2	10 (2/20)	1 (2/2)
4	70 (7/10)	4 (24/6)
5	10 (2/20)	5 (10/2)

APÊNDICE 2-

EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS DA CASA DE VEGETAÇÃO

TABELA 6 - FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DA CASA DE VEGETAÇÃO

TEMPO	SITUAÇÃO	MEIOS DE CULTURA:	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)
Após 30 dias	Claro	7	90 (10/11)	29 (290/10)
		8	86 (13/15)	17,15 (228/13)
	Escuro	7	100 (16/16)	42,88 (686/16)
		8	100 (19/19)	37,84 (719/19)
Após 60 dias	Claro	7	N.D	
		8		
	Escuro	7	100 (8/8)	55,71(390/7)
		8	100 (16/16)	54,25 (868/16)

NOTA: Após 60 dias, o número total de calos diminuiu, mas na realidade o número de placas que puderam ser observadas foi menor.

TABELA 7 - FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DA CASA DE VEGETAÇÃO, MANTIDOS NO ESCURO E AVALIADOS APÓS TRINTA DIAS

MEIOS	ϕ	1	2	3	4
% de explantes com calos (N1/N2)	0	0	6,25 (1/16)	0	37,5 (6/16)
Taxa de calogênese (N3/N1)	0	0	5 (5/1)	0	2,3 (14/6)

TABELA 8 - FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DA CASA DE VEGETAÇÃO, MANTIDOS, MANTIDOS NO ESCURO E AVALIADOS APÓS TRINTA DIAS

Meios	ϕ	1	2	3	4	5	6
% de explantes com calos (N1/N2)	0	0	13 (2/15)	0	10 (2/20)	0	5 (1/20)
Taxa de calogênese (N3/N1)	0	0	1 (2/2)	0	1 (2/2)	0	3 (3/1)

TABELA 9 - CALOGÊNESE NOS EXPLANTES FOLIARES DA CASA DE VEGETAÇÃO, MANTIDOS NO ESCURO E AVALIADOS APÓS TRINTA DIAS

Meios	ϕ	1	2	3	4	5	6
% de explantes com calos (N1/N2)	0	0	15 (3/20)	0	15 (3/20)	0	40 (8/20)
Taxa de calogênese (N3/N1)	0	0	3 (9/3)	0	1,3 (4/3)	0	2,5 (20/8)

APÊNDICE 3-

EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS GERMINADAS *IN VITRO*

TABELA 10 - CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES, MANTIDOS NO ESCURO, OBSERVADA APÓS 30 DIAS

MEIOS	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)	Nº DE EXPLANTES COM CALOS UNIDOS EM TODAS AS BORDAS	Nº DE EXPLANTES COM CALOS UNIDOS NA NERVURA CENTRAL
ϕ		Calogênese ausente		
1.1	75 (15/20)	5,3 (80/15)	0	0
2.2	100 (20/20)	10 (203/20)	0	1
3.3	100 (19/19)	8,6 (163/19)	0	0
4.4	84 (16/19)	8 (123/16)	0	0
5.5	85 (17/20)	16 (266/17)	0	1
6.6	95 (19/20)	18 (342/19)	0	2

4. EXPLANTES FOLIARES DA CASA DE VEGETAÇÃO

TABELA 11 - FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES NA AUSÊNCIA DE LUZ, AVALIADOS COM 30 DIAS

MEIOS	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)
ϕ	0	0
1.1	55 (11/20)	6,1 (67/11)
2.2	70 (14/20)	3,3 (47/14)
3.3	20 (4/20)	2 (8/4)
4.4	33 (5/15)	4,6 (23/5)
5.5	80 (12/15)	2,3 (27/12)
6.6	35 (7/20)	3,4 (24/7)

TABELA 12 - FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES NA AUSÊNCIA DE LUZ, AVALIADOS COM 30 DIAS

MEIOS	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)
ϕ		Ausência de calos
1.1	4 (1/24)	3 (3/1)
2.2		Ausência de calos
3.3		
4.4	3 (1/30)	2 (2/1)
5.5	2,5 (1/40)	1 (1/1)
6.6		Ausência de calos

APÊNDICE 4-

EXPLANTES RETIRADOS DE RAÍZES GERMINADAS *IN VITRO*

TABELA 13 - CALOGÊNESE NOS EXPLANTES AVALIADOS APÓS 30 DIAS, NA AUSÊNCIA DE LUZ

MEIOS	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)
ϕ		Ausência de calos
1.1	10 (4/40)	1,8 (7/4)
2.2	55 (22/40)	1,5 (33/22)
3.3	18 (7/40)	1,6 (11/7)
4.4	28 (11/40)	1,6 (18/11)
5.5	2 (1/40)	1 (1/1)
6.6	0 (0/40)	zero

TABELA 14 - CALOGÊNESE NOS EXPLANTES AVALIADOS APÓS 30 DIAS, NA AUSÊNCIA DE LUZ

MEIOS	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)
ϕ		Ausência de calos
1.1		
2.2	5 (2/40)	1 (2/2)
3.3	2 (1/40)	1 (1/1)
4.4	2 (1/40)	2 (2/1)
5.5	2 (1/40)	1 (1/1)
6.6	0 (0/40)	zero

TABELA 15 - CALOGÊNESE NOS EXPLANTES AVALIADOS APÓS 30 DIAS, NA AUSÊNCIA DE LUZ

MEIOS	% DE EXPLANTES COM CALOS (N1/N2)	TAXA DE CALOGÊNESE (N3/N1)
ϕ		Ausência de calos
1.1	12,5 (5/40)	1,25 (5/4)
2.2	10 (4/40)	1,5 (6/4)
3.3	5 (2/40)	1 (2/2)
4.4	20 (8/40)	5 (41/8)
5.5	10 (4/40)	1,3 (4/3)
6.6	5 (2/40)	13,5 (27/2)

APÊNDICE 5-

TESTES DO QUI-QUADRADO Reguladores de crescimento em mg.L⁻¹

1) Ho: A quantidade de calos nos dois meios são iguais, nos explantes *in vitro*. Ausência de luz.

TDZ	2,4-D	n° exp. c/calos	n° de exp.	n° de calos	Esperado	o-e	(o-e) ²	(o-e) ² /e
0,04	2	19	20	125	134	-9	81	0,6044776
0,06	1	17	20	143	134	9	81	0,6044776
		36	40	268	268			x ² =1,2089
								GL=2-1=1

O x² obtido é menor (<) que o x² crítico (3,84), logo a hipótese foi confirmada com a probabilidade menor que 5% de erro e 95% de acerto. Então a diferença entre o esperado e o obtido foi devida ao acaso e os dois meios, nas condições citadas, quando comparados entre si induzem a formação de calos igualmente.

2) Ho: Não existe diferença entre o número de calos observados e o esperado, nos seis meios, nos explantes foliares de plantas *in vitro*.

CIN	ANA	n° exp. c/calos	n° de exp.	n° de calos	Esperado	o-e	(o-e) ²	(o-e) ² /e
0,5	0,02	2	20	3	11,3	-8,3	68,89	6,0964602
0,5	0,10	7	20	7	11,3	-4,3	18,49	1,6362832
1	0,02	3	20	7	11,3	-4,3	18,49	1,6362832
1	0,10	11	20	32	11,3	20,7	428,5	37,919469
2	0,02	3	20	11	11,3	-0,3	0,09	0,0079646
2	0,10	4	20	8	11,3	-3,3	10,89	0,9637168
				120	68	67,8		x ² =48,2601

O x² obtido é maior (>) que o x² crítico (11,07), logo a hipótese não foi confirmada, com probabilidades idem a anterior. Então as diferenças entre os esperados e o observado não foram somente ao acaso, sendo assim nas condições citadas o meio com CIN 1mg/L e ANA 0,1mg/L, no qual existiu a maior diferença entre o observado e o esperado deve ser considerado o melhor meio, para indução de calos.

3) Ho: Nos explantes da casa de vegetação, a diferença entre a quantidade de calos observada e esperada não é significativa.

CIN	ANA	n° exp. c/calos	n° de exp.	n° de calos	Esperado	o-e	(o-e) ²	(o-e) ² /e
0,5	0,02	0	20	0	9,83	-9,8	96,63	9,83
0,5	0,10	6	20	16	9,83	6,17	38,07	3,8727263
1	0,02	0	20	0	9,83	-9,8	96,63	9,83
1	0,10	11	20	20	9,83	10,2	103,4	10,52176
2	0,02	0	20	0	9,83	-9,8	96,63	9,83
2	0,10	9	20	23	9,83	13,2	173,4	17,644852
				120	59	58,98		x ² =61,5293
								GL=6-1=5

O x² obtido foi menor (>) que o x² crítico (11,07), logo a hipótese não foi confirmada, com a probabilidade idem a anterior. Então a diferença entre o esperado e o obtido num determinado meio, nesse caso o meio 6, CIN 2 mg/L e ANA 0,1 mg/L, é maior que nos outros meios, isso demonstra que esse é o melhor meio para indução de calos, nas condições citadas.

NOTAS: Os explantes foram mantidos na presença ou ausência de luz.

Abreviaturas ; n°ex. c/ calos (Número de explantes com calos), n° de calos (Número de calos), n° de exp. (Número de explantes), o (observado), e (esperado) e x² (Qui-quadrado).

O χ^2 obtido $<$ χ^2 crítico(3,84), logo a hipótese foi confirmada, com a probabilidade menor que 5% de erro e 95% de acerto, então a diferença entre o esperado e o obtido foi somente ao acaso. Isso demonstra que não existiu um meio melhor nessas condições.

8) H_0 : Os dois meios induzem a calogênese, nos explantes da planta da casa de vegetação, com a mesma intensidade da presença ou não de luz.

TDZ	2,4-D	n°exp. c/calos	n°de exp.	n° de calos	esperado	o-e	(o-e) ²	(o-e) ² /e
0,04	2	18	24	471	612,27	-141	19957	32,595445
0,06	1	24	24	369	612,27	-243	59180	96,657182
Dados de explantes no escuro :		16	20	686	510,22	176	30899	60,559383
		19	20	719	510,22	209	43589	85,431948
			88	2245	2244,98			$\chi^2=275,243$
								GL=4-1=3

O χ^2 obtido $>$ χ^2 crítico(7,81), logo a hipótese não foi confirmada, com probabilidades idem a anterior. Então a diferença entre o esperado e o obtido foi significativa e isso foi devido a um meio ser melhor que os outros e também depende das condições (ausência ou presença de luz).

9) H_0 : Nos explantes das raízes os meios induzem igualmente a calogênese.

BA	ANA	n°exp. c/calos	n°de exp.	n°de calos	esperado	o-e	(o-e) ²	(o-e) ² /e
0,5	0,02	9	120	12	30,66	-19	348,2	11,356673
0,5	0,1	28	120	41	30,66	10,3	106,92	3,4871363
1	0,02	10	120	14	30,66	-17	277,56	9,0526941
1	0,1	20	120	61	30,66	30,3	920,52	30,02334
2	0,02	6	120	6	30,66	-25	608,12	19,834168
2	0,1	2	120	50	30,66	19,3	374,04	12,199465
			720	184	183,96			$\chi^2=85,9534$
								GL=6-1=5

O χ^2 obtido $>$ χ^2 crítico(11,07), logo a hipótese não foi confirmada, com a probabilidade menor que 5% de erro e 95% de acerto, então a diferença entre o esperado e o obtido não foi ao acaso somente, as diferenças são significativas e o teste indica que o meio com BA 1 mg/L e ANA 0,1 mg/L foi o melhor.

10) H_0 : O número de raízes no meio 15, nos explantes *in vitro* retirados dos seis meios são iguais.

M(15)CIN	ANA	n°exp. c/raízes	n° de raízes	n° de exp.	Esperado	o-e	(o-e) ²	(o-e) ² /e
0,25	0,5	11	30	19	30,01	-0	0,0001	3,332E-06
0,25	0,5	14	43	19	30,01	13	168,74	5,6227957
0,25	0,5	5	22	20	31,59	-9,6	91,968	2,9113042
0,25	0,5	16	69	21	33,17	35,8	1283,8	38,703313
0,25	0,5	6	24	20	31,59	-7,6	57,608	1,8236182
0,25	0,5	0	0	20	31,59	-32	997,93	31,59
			188	119	187,96			$\chi^2=80,6510$
								GL=6-1=5

O χ^2 obtido $>$ χ^2 crítico (11,07), logo a hipótese não foi confirmada, com as probabilidades idem a anterior. Então a diferença entre o esperado e o obtido não foi ao acaso somente, sendo assim o maior valor do observado demonstra que o meio com BA 1 mg/L e ANA 0,1 mg/L é o melhor na indução de raízes.

continua

11) H_0 : O número de raízes no meio 16 nos explantes *in vitro* retirados dos seis meios são iguais.

M(16)CIN	ANA	n°exp. c/raízes	n°. de raízes	n° de exp.	esperado	o-e	(o-e) ²	(o-e) ² /e
0,25	1	3	3	20	9,74	-6,7	45,428	4,6640246
0,25	1	10	18	20	9,74	8,26	68,228	7,0048871
0,25	1	7	12	20	9,74	2,26	5,1076	0,5243943
0,25	1	5	17	19	9,26	7,74	59,908	6,4695032

A hipótese não foi confirmada, pois o χ^2 obtido foi $>$ que o χ^2 crítico (3,84), com probabilidade de 95% de certeza. Logo, a maior diferença entre o observado e o esperado confirmou que os explantes de folhas da planta da casa de vegetação, nos meios com TDZ e 2,4-D, induzem maior número de calos.