CULTURA DE TECIDOS DE *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Cv. IRI 1022: ESTUDO MORFOGENÉTICO E HISTOLÓGICO

BENEDITA APARECIDA DA SILVA
Bióloga

Orientadora: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1991

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

Silva, Benedita Aparecida da
S586c Cultura de tecidos de Stylosanthes guianensis (Aubl.) Sw. Cv. IRI 1022: estudo morfogenético e histológico. Piracicaba, 1991.
169p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Estilosante - Cultura de tecido 2. Estilosante - Melhoramento I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.39

CULTURA DE TECIDOS DE *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.

Cv. IRI 1022: ESTUDO MORFOGENÉTICO E HISTOLÓGICO

BENEDITA APARECIDA DA SILVA

Aprovada em: 22/01/92

Comissão Julgadora:

Maria Lucia Carneiro Vieira	ESALQ/USP
Akihiko Ando	ESALQ/USP
Jane Elisabeth Kraus	IBC/USP

Maria Lucia Carneiro Vieira

PROFª DRª MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA

Orientadora

AGRADECIMENTOS

Meu reconhecimento às pessoas e às instituições que comigo colaboraram de modo a tornar possível a realização deste trabalho:

- À Profª Drª Maria Lúcia Carneiro Vieira, pela orientação;

- À Profª Drª Aline Ap. Pizzirani-Kleiner, pela oportunidade de estágio e colaboração nos encaminhamentos burocráticos do curso de pós-graduação;

- Ao Engº Agrº Dario Grattapaglia e a Profª Drª Jane Elisabeth Kraus, pela amizade, incentivo, e, efetivo e inestimável auxílio na condução dos experimentos, assim como, nas discussões teóricas;

- Ao Engº Agrº Nuno M. Sousa Costa, pela presteza na cessão de sementes da cv IRI 1022, pelos ensinamentos e cordialidade;

- Aos Profs. Drs. Mario Tomazello Filho e Gehard Bandel, pela disponibilidade de pessoal técnico e equipamentos;

- Ao Prof. Dr. Cosme Damião da Cruz, pela generosidade e colaboração;

- Ao Departamento de Matemática e Estatística da ESALQ, nas pessoas do Prof. Dr. Humberto de Campos, Profª Drª Maria Cristina S. Nogueira e Profª Maria Izalina Ferreira Alves, pelas sugestões e colaboração;

- Ao Prof. Dr. Belmer Garcia Negrillo e ao Marcelo Corrêa Alves, pela ajuda na realização e interpretação da análise estatística dos dados;

- À Engº Agrº Bernadete Silvarolla pela amizade, sugestões e colaboração prestada;

- Aos funcionários do Departamento de Genética da ESALQ, principalmente ao Carlos Alberto de Oliveira, pela amizade e ajuda durante os ensaios de laboratório e a Carmem M. S. Pilotto, pela gentileza e colaboração;

- À bibliotecária Kátia M. de Andrade Ferraz, pela gentileza e correção das citações bibliográficas;

- Às graduandas Rosana Bessi e Helena Kiyoe Ito, pelo apoio e colaboração;

- A Srtª Sandra Giovanoni, pelo excelente trabalho de digitação;

- A Cláudia Silva, Francisco Terasawa Junior, Liliane Keigo Mitsunaga e Mariângela Cristófane, amigos em todos os momentos;

- A minha família, pelo apoio e compreensão por tantos momentos de ausência;

- Ao Departamento de Genética, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pela possibilidade de realização do mestrado;

- Ao CNPq (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa.

S U M Á R I O

Página

LISTA DE TABELAS viii

LISTA DE FIGURAS xii

LISTA DE ABREVIATURAS xv

RESUMO xvi

SUMMARY xix

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 3

2.1. O Gênero *Stylosanthes*: Considerações Gerais .. 3

2.2. Cultura de Tecidos: Considerações Gerais 10

2.2.1. Cultura de tecidos na família Leguminosae 14

2.2.1.1. Genótipo 16

2.2.1.2. Variação somaclonal 21

2.2.1.3. Origem e estado fisiológico do explante 24

2.2.1.4. Condições químicas e físicas da cultura 27

2.2.2. Avanços da cultura de tecidos no gênero *Stylosanthes* 42

2.2.3. Estudos cito-histológicos da morfogênese *in vitro* 47

3. MATERIAL E MÉTODOS 60

3.1. Material Botânico 60

Página

3.2. Métodos 60

3.2.1. Obtenção de explantes 60

3.2.2. Estabelecimento de culturas de calo, regeneração e aclimatação de plantas .. 63

3.2.2.1. Estabelecimento de culturas de calo 64

3.2.2.2. Regeneração e aclimatação de plantas 68

3.2.2.3. Efeito dos fatores fitorregulador e genótipo sobre o crescimento e potencial morfogenético de calos 72

3.2.3. Análise estatística dos dados 75

3.2.4. Histologia dos calos cultivados *in vitro* 78

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 80

4.1. Análise do efeito de Fitorreguladores no Estabelecimento de Culturas de Calo 80

4.2. Análise dos Processos de Regeneração e Aclimatação de Plantas Inteiras (SC_1) 97

4.3. Análise do Efeito dos Fatores Fitorregulador e Genótipo Sobre o Crescimento e o Potencial Morfogenético de Calos 105

Página

4.3.1. Análise do efeito da fonte auxínica em conjunto com BAP e dos genótipos 106

4.3.2. Análise do efeito dos fitorreguladores NAA e BAP em três combinações distintas e dos genótipos 110

4.3.3. Análise do efeito dos fitorreguladores NAA e BAP combinados em concentrações proporcionalmente aumentadas e diminuídas em relação a um meio controle e dos genótipos 113

4.3.4. Análise do efeito dos fitorreguladores NAA e BAP sob duas condições de luminosidade e dos genótipos 118

4.3.5. Análise do efeito de três genótipos SC_2 e dos fitorreguladores NAA e BAP 123

4.4. Estudo Histológico dos Calos 129

5. CONCLUSÕES 151

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 154

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Caracteres de importância agronômica em espécies do gênero *Stylosanthes*.	5
2	Respostas morfogenéticas em explantes foliares de *Stylosanthes guianensis* cv. IRI 1022 após 30 dias de cultura em meio MS (16 h luz /8 h escuro).	81
3	Valores médios das variáveis peso fresco (g), número de gemas e/ou brotos (Nº G/B)*, cor* e textura* por calo e por meio de cultura após 30 dias de cultivo *in vitro*.	85
4	Comparações múltiplas para variável peso fresco de calos induzidos em meios MS suplementados com 20 combinações de NAA e BAP após 30 dias de cultura.	89
5	Comparações múltiplas para variável número de gemas e/ou brotos (Nº G/B) em calos induzidos em meios MS suplementados com 20 combinações de NAA e BAP após 30 dias de cultura.	91
6	Comparações múltiplas para variável cor em calos induzidos em meios MS suplementados com 20 combinações de NAA e BAP após 30 dias de cultura.	92

Tabela		Página
7	Comparações múltiplas para variável textura em calos induzidos em meios MS suplementados com 20 combinações de NAA e BAP após 30 dias de cultura.	93
8	Comparações múltiplas para as variáveis peso fresco, número de gemas e/ou brotos, cor e textura, em calos induzidos em meios MS suplementados com 20 combinações de NAA e BAP após 30 dias de cultura.	94
9	Número de plantas obtidas a partir de calos mantidos por 30 dias em meios de indução (MI) e posteriormente transferidas para meios de regeneração (MR).	101
10	Número de plantas SC_1 transplantadas e sobreviventes em função dos períodos de transplantios para ambientes *ex vitro*.	101
11	Estatísticas obtidas para o fator A (dois meios de cultura suplementados com fontes auxínicas distintas) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo.	107
12	Estatística Q obtida para o fator B (50 genótipos) e para a interação AB (dois meios de cultura versus 50 genótipos) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo.	109

Tabela Página

13 Estatísticas obtidas para o fator A (três meios de cultura suplementados com concentrações distintas de NAA e BAP) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo. 111

14 Estatística Q obtida para o fator B (50 genótipos) e para a interação AB (três meios de cultura versus 50 genótipos) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo. 112

15 Estatísticas obtidas para o fator A (três meios de cultura suplementados com NAA e BAP em concentrações proporcionalmente aumentadas e diminuídas em relação a um meio controle) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo. 114

16 Estatística Q obtida para o fator B (30 genótipos) e para a interação AB (três meios de cultura versus 30 genótipos) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo. 115

17 Estatísticas obtidas para o fator A (dois meios de cultura sob duas condições de luminosidade) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo. 119

Tabela Página

18 Estatística Q obtida para o fator B (30 genótipos) e para a interação AB (dois meios de cultura sob duas condições de luminosidade versus 30 genótipos) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo. 120

19 Estatísticas obtidas para o fator A (dois meios de cultura) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo. 123

20 Estatísticas obtidas para o fator B (três genótipos SCz) e para a interação AB (dois meios de cultura versus três genótipos SCz) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo. 124

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Frascos de cultura utilizados nas diferentes etapas do processo de regeneração de plantas *in vitro*	61
2	Aspecto geral da planta de *Stylosanthes guianensis* cultivada *in vitro* e detalhe do folíolo usado na obtenção do explante (seta) para a indução de calo.	63
3	Respostas morfogenéticas obtidas após 30 dias de cultivo *in vitro* de explantes foliares de *S. guianensis* - cv IRI 1022.	83
4	Procedimento geral usado para a obtenção de plantas inteiras regeneradas *in vitro* (SC_1) na cultivar IRI 1022.	99
5	Efeito das concentrações de fitorreguladores no meio de indução sobre o crescimento e potencial morfogenético dos calos.	117
6	Efeito da condição de luminosidade sobre o crescimento e potencial morfogenético dos calos.	122
7	Crescimento e potencial morfogenético apresentado por calos oriundos de três genótipos SC_2 (G32, G83 e G113) e característica vegetativa apresentada por planta parental SC_1 (G83).	127

Figura		Página
8	Caracterização a nível da morfologia externa do desenvolvimento de calos mantidos em meio de indução.	133
9	Aspectos estruturais dos folíolos de *Stylosanthes guianensis* cv IRI 1022.	134
10	Aspectos estruturais do explante foliar obtido de planta germinada a partir de semente e mantida *in vitro*.	135
11	Cortes transversais dos explantes foliares com 2 dias de cultura *in vitro*.	137
12	Cortes longitudinais dos explantes foliares com 2 dias de cultura *in vitro*.	138
13	Cortes longitudinais dos explantes foliares com 3 dias de cultura *in vitro*.	139
14	Cortes transversais e longitudinais dos explantes foliares com 4 dias de cultura *in vitro*.	142
15	Cortes longitudinais dos explantes foliares com 5 dias de cultura *in vitro*.	143
16	Cortes longitudinais dos explantes foliares com 7 dias de cultura *in vitro*.	144

Figura		Página
17	Cortes longitudinais de calos com 10 dias de cultura *in vitro*.	145
18	Cortes transversais de calos com 25 dias de cultura *in vitro*.	146
19	Cortes transversais de calos com 30 dias de cultura *in vitro*.	147
20	Aspectos estruturais do calo após 30 dias de cultura *in vitro*.	150

LISTA DE ABREVIATURAS

- Reguladores de crescimento

  IAA - ácido indolacético

  IBA - ácido indolbutírico

  NAA - Ácido naftalenoacético

  2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

  BAP - Benzilaminopurina

  KIN - Cinetina

  2iP - adenina 2-isopentil

- Meios basais

  MS - Murashige & Skoog (1962)

  B_5 - Gamborg *et alii* (1968)

  SH - Schenk & Hildebrandt (1972)

  L_2 - Phillips & Collins (1979)

- Fixador

  FAA - Formaldeido : Ácido Acético : Álcool etílico

- Instituições

  CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colômbia

  IRI - Instituto de Pesquisas IRI, Matão - SP, Brasil

  EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

- Nomenclatura utilizada para designar regenerantes primários e suas progênies

  plantas SC_1 - regenerantes primários

  plantas SC_2 - progênies oriundas de autofecundação de plantas SC_1

CULTURA DE TECIDOS DE *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. CV. IRI 1022: ESTUDO MORFOGENÉTICO E HISTOLÓGICO

Autora: Benedita Aparecida da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira

RESUMO

A espécie *Stylosanthes guianensis*, importante forrageira para as regiões tropicais do globo, vem se estabelecendo a partir da década de 80 como um sistema modelo em potencial, para a tecnologia da cultura de tecidos na família Leguminosae (MEIJER & SZABADOS, 1990).

No presente estudo, avaliou-se o potencial morfogenético *in vitro* de uma cultivar pertencente a esta espécie, a IRI 1022, em relação aos fatores genótipo e meio de cultura, mais especificamente, a reguladores de crescimento. A indução de calos foi obtida a partir de explantes foliares da cv IRI 1022 colocados em meios basais MS suplementados com combinações dos fitorreguladores NAA e BAP, nas concentrações 0,0; 0,1; 0,4; 1,0 e 2,0 mg/l, sob fotoperíodo de 16 horas luz e temperaturas entre 25 a 28°C.

Entre estas combinações foram selecionadas favoravelmente, aquelas capazes de promover fases de calo

mais prolongadas e ainda a regeneração de partes aéreas nestes calos durante o período de indução de 30 dias.

Calos induzidos nestas condições foram transferidos após 30 dias para meios de regeneração, isto é, meios MS suplementados apenas com BAP, onde a concentração 2,0 mg/l, mostrou-se a mais satisfatória.

Brotos regenerados foram alongados em meio MS com as concentrações de sais reduzidas à metade e a um quarto, e concentração de BAP também reduzida ou ausente.

A implementação do enraizamento em brotos alongados se deu em meio MS reduzido à metade e a um quarto, e suplementado com 0,2 mg/l de IBA. As maiores taxas de sobrevivência de plantas regeneradas *in vitro* se deu sob condições elevadas de umidade relativa, luminosidade e temperatura.

Plantas SC_1 (regenerantes primários) avaliadas preliminarmente, apresentaram variações quanto a alguns aspectos vegetativo e reprodutivo; progênies destas plantas por sua vez, quando submetidas a cultura, demonstraram variabilidade para o caráter regeneração.

A indução de calos e a organogênese de partes aéreas nestes, foram igualmente avaliadas a nível estrutural.

Os eventos chaves que levam a indução de calos em explantes foliares da cultivar IRI 1022, ocorrem entre o segundo e o terceiro dias de cultura; a desdiferenciação e a proliferação celulares têm início nas regiões de ferimento

do explante, notadamente a nível da nervura principal, em células do parênquima e da bainha do feixe vascular.

No quinto dia de cultura, já é evidente a nível da morfologia externa, o início de formação de calo. Em torno do décimo dia de cultura já se observa a presença de meristemóides. Trinta dias após a inoculação do explante, são evidentes as gemas caulinaes.

O processo de regeneração ocorre por organogênese, com os brotos desenvolvendo na superfície dos calos.

TISSUE CULTURE ON *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. CV. IRI 1022: MORPHOGENETIC AND HISTOLOGICAL STUDY

Author: Benedita Aparecida da Silva

Adviser: Profa. Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira

SUMMARY

Since the 80's decade, *Stylosanthes guianensis*, an important forage species for world tropical regions, has been established as a potential model system for tissue culture in the Leguminosae family (MEIJER & SZABADOS, 1990).

In the present study, *S. guianensis* cultivar IRI 1022 *in vitro* morphogenetic potential was evaluated; genotype and culture media, specifically, growth regulators was studied.

Calli induction was obtained from IRI 1022 leaves explants placed on the MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) basal medium supplemented with combinations of NAA and BAP at 0.0, 0.1, 0.4, 1.0 and 2.0 mgl^{-1} concentrations. Cultures were maintained at 25 to 28°C, under 16 hs light regime.

Plant growth regulator combinations able to promote extended callus phase and shoot regeneration in a 30 days period were selected. The derived calli were then

transferred to auxin free MS regeneration media; 2.0 mgl^{-1} BAP was the more satisfactory concentration for shoot regeneration.

Shoots were elongated in half-and-quarter-strength MS medium, free of hormones or supplemented with reduced BAP concentration. Rooting was induced in the same basal medium supplemented with 0.2 mgl^{-1} IBA.

Regenerated plantlets, when transferred to the soil, showed greater survival rates under high humidity, light and temperature conditions. SC_1 plants (primary regenerants) showed some variations related with morphological and reproductive aspects; progênies of SC_1 plants showed variability in *in vitro* regenerative ability.

Histological analyses of calli induction and shoot regeneration processes were performed. Leaf explants derived calli were induced by hystological events that occur between the second and the third day of culture; dedifferentiation and cellular proliferation begin in regions closed to lesions caused by explant excision, mainly at the central vein, involving both, cells of the vascular parenchyma and sheath of the bundle.

On the fifth day of culture calli began to be evident at the level of external morphology. After the tenth day of culture meristemoids can be observed. After thirty days of explants inoculation shoot buds are evident.

Regeneration process occurs by organogenesis, with shoot development on calli surfaces.

1. INTRODUÇÃO

O requisito básico para se explorar as técnicas da cultura de tecidos vegetais em diversas áreas como a morfologia, bioquímica, patologia e genética, consiste na regeneração rotineira de plantas em número suficiente.

Entre as espécies cultivadas, procura-se aquelas que possam servir como modelo não apenas para esclarecer os mecanismos que restringem a regeneração *in vitro*, como também, para se verificar a potencialidade destas técnicas em resolver problemas relativos ao melhoramento de plantas.

Na família Leguminosas, o gênero *Stylosanthes*, importante do ponto de vista agronômico por conter espécies forrageiras altamente adaptadas a regiões tropicais que apresentam condições climáticas e edáficas desfavoráveis, destaca-se dentro desta abordagem biotecnológica.

O relatos de sucesso na aplicação de técnicas de cultura de tecidos neste gênero vêm aumentando e envolvendo principalmente a espécie forrageira *S. guianensis*, que além de fácil manipulação, demonstra elevada responsividade ao cultivo *in vitro*.

Ademais, muitos obstáculos enfrentados em programas de melhoramento genético desta espécie em particular e do gênero como um todo poderão ser superados com a introdução em tais programas, de técnicas de cultura de tecidos que já se mostraram viáveis.

O genêro *Stylosanthes*, portanto, apresenta uma tendência evidente de tornar-se um sistema modelo de estudos e aplicações destas tecnologias e, para que isto se concretize, é necessária a aquisição de um número cada vez maior de informações acerca do cultivo deste sistema *in vitro*.

Neste contexto, foram objetivos do presente estudo:

1) a indução e crescimento de calos a partir de explantes foliares da cultivar IRI 1022;

2) acompanhar e caracterizar o desenvolvimento morfológico de calos originados a partir de explantes foliares da cultivar IRI 1022;

3) acompanhar e caracterizar a nível anatômico o desenvolvimento ontogenético de calos originados a partir de explantes foliares da cultivar IRI 1022, e;

4) otimizar o processo de aclimatação de plantas inteiras, regeneradas *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Gênero *Stylosanthes*: Considerações Gerais

O gênero *Stylosanthes*, assim denominado por O. Swartz, em 1788, pertence a subtribo Stylosanthinae, tribo Aeschynomeneae, subfamília Papilionoideae, família Leguminosae (RUDD, 1981). Sua distribuição geográfica natural concentra-se principalmente nas regiões tropicais e subtropicais das Américas, destacando-se o Brasil como o seu maior centro de diversidade genética (FERREIRA & COSTA, 1979; WILLIAMS *et alii*, 1984) e a Austrália como o local onde ocorreu o maior número de introduções de espécies potencialmente forrageiras (T'MANNETJE, 1984).

As espécies e subespécies pertencentes a este gênero, cerca de 50 ao todo, são frequentemente revistas (MOHLENBROCK, 1958; FERREIRA & COSTA, 1979; COSTA & FERREIRA, 1984; T'MANNETJE, 1977, 1984) e parece estar longe de um consenso entre os pesquisadores em relação a taxonomia do grupo.

Ao longo de sua história taxonômica, o gênero *Stylosanthes* vem sendo subdividido em duas seções subgenéricas, seção Styposanthes e seção Stylosanthes, com base

respectivamente na presença ou ausência de um eixo rudimentar, um pequeno apêndice na base do fruto, que é uma vagem do tipo lomento (KIRKBRIDE & KIRKBRIDE, 1987).

STACE & CAMERON (1984), discutem o significado citológico e evolutivo desta subdivisão. O número cromossômico haplóide do gênero é 10. Até o momento, todas as espécies classificadas dentro da seção Stylosanthes são diplóides (2n = 20), o que se constitue em um forte indício da não existência de poliplóides na mesma. Pertencem a esta seção importantes espécies do ponto de vista econômico, tais como, *S. guianensis*, *S. humilis*, *S. viscosa* e *S. leiocarpa*.

Na seção Styposanthes, por outro lado, são encontradas espécies diplóides e poliplóides. Também aí se encontram espécies de importância econômica, tais como *S. scabra* e *S. capitata*, ambas com número cromossômico 2n=40.

Ainda de acordo com estes autores, a obtenção de híbridos envolvendo cruzamentos interespecíficos é grandemente limitada pela existência de fortes barreiras meióticas.

A grande importância do gênero *Stylosanthes* reside no fato dele conter uma grande disponibilidade de espécies potencialmente forrageiras as quais se mostram adaptadas a áreas secas e/ou de solos pobres dos trópicos e subtrópicos, onde caracteristicamente a relação entre produção de pastagem e produtividade animal é baixa e o uso de fertilizantes economicamente inviável (FERREIRA & COSTA, 1979; EDYE & CAMERON, 1984). Em espécies ou mesmo variedades taxo-

nômicas do gênero onde existem dados relevantes disponíveis, é evidente a ocorrência de ampla variabilidade em caracteres de importância taxonômica e/ou agronômica (Tabela 1).

Tabela 1. Caracteres de importância agronômica em espécies do gênero *Stylosanthes*.

ATRIBUTO	*S. guianensis* (var. *guianensis*)	*A. capitata*	*S. humilis*	*S. scabra*
Para adaptação regional				
. tolerância a toxidez de Al	+v	+v	−	+v
. tolerância a solos alcalinos				+
. tolerância a solos salinos			−	
. tolerância a solos descobertos			−n	+
. tolerância a inundação	+v		+	−v
. tolerância a seca	−v	+		+
. resistência ao fogo	−v		−	+v
. tolerância ao frio	−v			+v
. tolerância ao pisoteio intenso			+	+
Para persistência				
. resistência à antracnose	+v	+v	+v	+v
. resistência a brocas	+v	+v		+v
. resistência a nematóides	+v	+v		
. florescimento	+v	+v	+v	+v
. maturação de sementes	+v		+v	+v
. produção de sementes	+v	+v	+v	+v
. estabilidade na produção	+v			
. dormência	+	+	+	+v
. "banco" de sementes	+v		+v	+v
. regeneração de plântulas	+v	+v	+	+v
. longevidade	+v	+v	−n	+v
Para produção				
. associações com *Rhizobium*	+v	+n	+v	+v
. produção de matéria seca	+v	+v	+v	+v
. produção sazonal	+v	+v	+v	+v
. palatabilidade	+	+	+	+v
. digestibilidade *in vitro*	+v	+v	+v	
. produção animal	+		+	

Retirada de EDYE et alii (1984), simplificada. Onde:
+ = atributo desejável presente;
− = atributo desejável ausente;
v = ocorrência de variação intra-específica para o atributo;
n = ausência de variação intra-específica para o atributo.
Os espaços em branco representam dados não conhecidos.

Estudos revelam que esta variabilidade deve-se a fatores genéticos e ambientais (BARROS, 1978; BATTISTIN & MARTINS, 1988), sendo responsável pelo sucesso agronômico das espécies, uma vez que, plantas forrageiras tropicais e subtropicais para serem bem sucedidas devem estar adaptadas a amplas faixas de condições climáticas e edáficas (EDYE *et alii*, 1984; WILLIAMS *et alii*, 1984).

Entre as espécies pertencentes a este gênero, a *S. guianensis* (Aubl.) Sw. é a de maior distribuição natural, extendendo-se desde o México até a Argentina; sendo encontrada ainda em outros países tropicais, como a Austrália, onde foi introduzida (COSTA & FERREIRA, 1984; THOMAS, 1984).

S. guianensis é também a espécie do gênero que apresenta maior variabilidade de caracteres (MOHLENBROCK, 1958). As plantas são perenes, herbáceas e vigorosas cujo hábito de crescimento, em geral, varia de totalmente ereto até prostrado; apresentam ainda variações quanto a produção, coloração, maturação, germinação das sementes ao longo do tempo (ISON & HUMPHREYS, 1984), número de dias para o início do florescimento, o qual se mostra condicionado ao fotoperiodismo (TRONGKONGSIN & HUMPHREYS, 1987) e outros caracteres como vigor, valor nutricional, tolerância a pragas e doenças, etc. (IRWIN *et alii*, 1984; LITTLE *et alii*, 1984).

A extensa variabilidade encontrada nesta espécie tem gerado problemas de identificação e caracterização taxonômica.

FERREIRA & COSTA (1979) adotam a subdivisão proposta por MOHLENBROCK (1958) em subespécie *guianensis* e *dissitiflora* e classificam a subespécie *guianensis* nas variedades *canescens*, *microcephala* e *vulgaris*. Mais recentemente, a variedade *vulgaris* foi desmembrada, dando origem a uma quarta variedade, var. *pauciflora* (Brandão *et alii*, citados por VIEIRA, 1988).

No que diz respeito ao seu mecanismo reprodutivo, *S. guianensis* não é uma espécie exclusivamente de autofecundação e pode mesmo apresentar altas taxas de cruzamento aberto, pelo menos para alguns genótipos ou sob certas condições ambientais, como por exemplo, a presença de agentes polinizadores em tipo e número adequados (MILES, 1985).

De acordo com EDYE *et alii* (1984), as duas primeiras espécies do gênero a ter seus potenciais forrageiros reconhecidos foram *S. humilis*, na Austrália em 1914 e *S. guianensis* no Brasil em 1933.

A partir de 1973, novas espécies passaram a ser comercializadas na Austrália (*S. hamata* e *S. scabra*); Colômbia (*S. capitata*) e Brasil (*S. macrocephala*).

No entanto, a espécie *S. guianensis* continuou sendo a mais aplicada em programas de seleção e melhoramento; os ecótipos selecionados têm sido utilizados como forragem, ou ainda, adubo verde, cultura de cobertura em associação a culturas arbóreas e para conservação do solo (EDYE *et alii*, 1984; THOMAS, 1984).

Entre as cultivares lançadas encontra-se a IRI 1022, pertencente, de acordo com a classificação proposta por FERREIRA & COSTA (1979), à variedade *canescens*. HYMOWITZ *et alii* (1967) relatam que esta cultivar é oriunda de um ecótipo coletado por Friedrich Gullove, em 1962, nas proximidades de Matão (SP) e posteriormente selecionado pelo Instituto de Pesquisas IRI sediado em Matão (SP). Do ponto de vista agronômico, constitui-se em uma forrageira vigorosa, com boa resistência a seca, embora apresente melhor desempenho em condições climáticas e edáficas mais favoráveis; consorcia-se bem com os capins pangola, gordura, mimoso, etc., e pode sobreviver ao fogo (ALCANTARA & BUFARAH, 1982). Embora apresente características agronômicas bastante desejáveis e tenha sido amplamente cultivada, principalmente no Estado de São Paulo, esta cultivar não é mais produzida em escala comercial em decorrência de sua alta susceptibilidade à antracnose (doença causada pelo fungo *Colletrotrichum gloesporioides* e que representa a maior limitação da cultura do gênero como um todo e a nível mundial) ficando, portanto, sua multiplicação restrita as instituições de pesquisa (EDYE & CAMERON, 1984; THOMAS, 1984; COSTA, 1989, comunicação pessoal).

O avanço nas pesquisas, tem revelado novas espécies com potencial forrageiro, como é o caso da *S. fruticosa*, *S. leiocarpa*, *S. sympodialis* e *S. viscosa* (EDYE *et alii*, 1984).

Os programas de melhoramento nas espécies do gênero *Stylosanthes* visam basicamente a produção de cultivares capazes de persistir e manter uma produtividade relativamente estável em ambientes permanentemente pastoreados; os ambientes nos quais estes programas são desenvolvidos apresentam grandes contrastes no que diz respeito a tipos de climas e solos; consequentemente, os objetivos divergem em cada programa em particular (EDYE & CAMERON, 1984). No entanto, além dos objetivos específicos, todos os programas de melhoramento neste gênero visam atualmente encontrar uma fonte de resistência permanente ao fungo causador da antracnose que representa, como já foi mencionado anteriormente, a maior limitação a nível mundial para o seu uso extensivo (IRWIN & CAMERON, 1978; DAVIS *et alii*, 1987).

DAVIS (1987) menciona reduções na produção de matéria seca, em função da antracnose, iguais a 58% e 36% em *S. hamata* e *S. guianensis*, respectivamente, verificadas em estudos realizados na Flórida e América do Sul; no Norte da Austrália, as perdas encontradas foram de 22% para *S. scabra*, 67% para *S. hamata* e 54% para *S. guianensis*.

Na América do Sul, os programas de melhoramento em *Stylosanthes*, conduzidos pelo CIAT na Colômbia têm, ainda como um dos principais objetivos, encontrar uma fonte de resistência segura às brocas (*Caloptillia* sp.), principal praga das espécies cultivadas naquela região (CAMERON *et alii*, 1984; EDYE & CAMERON, 1984).

O desenvolvimento de materiais elites, resistentes a pragas e doenças, persistentes e produtivos, é a premissa básica para que *Stylosanthes* spp. possa ter seu potencial explorado tanto na formação de pastagens, como em sistemas de cultivo.

Todavia, a falta de informações sobre sistemas de cruzamento, estrutura populacional e genética das espécies, as dificuldades na realização de polinização manual, a existência de barreiras para a troca gênica dentro e entre espécies e a ampla variação de raças do fungo causador da antracnose, restringem grandemente o avanço nos programas de melhoramento deste gênero (CAMERON *et alii*, 1984).

Neste contexto, novas tecnologias como a mutação induzida (ALCANTARA *et alii*, 1988) e a cultura de tecidos (MEIJER & SZABADOS, 1990) abrem novas perspectivas ao melhoramento genético em *Stylosanthes*, pois, aliadas aos métodos convencionais elas podem superar obstáculos intrínsecos a estes métodos, na obtenção de materiais elites.

2.2. Cultura de Tecidos: Considerações Gerais

As técnicas da cultura de tecidos vegetal oferecem uma excelente oportunidade para se estudar os fatores que elucidam a totipotência celular, bem como aqueles controladores da diferenciação citológica, histológica e organogênica de plantas (BHOJWANI & RAZDAN, 1983). Além disso, estas técnicas trazem significantes contribuições para a

indústria através da produção de compostos secundários úteis, e, para a agricultura através da propagação clonal, produção de plantas livres de patógenos, obtenção de mutantes, plantas haplóides e transformadas geneticamente *in vitro*, entre outras (EVANS *et alii*, 1983).

O requisito básico para se explorar tais técnicas é a regeneração rotineira de plantas e em número suficiente a partir do explante cultivado (HAMMATT *et alii*, 1986).

Os vegetais são constituídos por uma heterogeneidade de fenótipos celulares os quais são conseqüência dos processos de diferenciação e desenvolvimento.

Os mecanismos apontados como os responsáveis pelo aparecimendo desta heterogeneidade são aqueles controladores da repressão e expressão gênica durante o desenvolvimento, tais como, elementos transponíveis, amplificação gênica, metilação do DNA (LEE & PHILLIPS, 1988) entre outros.

Mudanças na expressão gênica e portanto no fenótipo das células influenciam fortemente a capacidade celular na produção de calos e/ou regeneração de plantas **in vitro** (MORRISH *et alii*, 1987).

Segundo HALPERIN (1986), existem três possibilidades gerais que explicam a incapacidade que muitas espécies apresentam em relação a regeneração *in vitro*: 1. bloqueio genético envolvendo a falta de totipotência; 2. bloqueio epigenético envolvendo restrições estáveis, po-

rém, potencialmente reversíveis, sobre o funcionamento dos genes requeridos para a formação e crescimento dos órgãos; 3. bloqueio fisiológico, no sentido de que, as células podem ser geneticamente capazes de responder aos sinais morfogenéticos *in vitro*, não existem restrições epigenéticas atuando, no entanto, os "sinais" requeridos do ambiente, estão ausentes.

A regeneração de plantas através da cultura de tecidos ocorre por duas vias de desenvolvimento — a embriogênese somática e a organogênese — e qualquer uma delas, pode se dar diretamente a partir do explante ou indiretamente depois da passagem pela fase de calo (BROWN & THORPE, 1986).

Porém, qualquer que seja a via de regeneração, ela será iniciada e controlada por influências ambientais e do desenvolvimento (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986).

Na embriogênese somática, um novo indivíduo com estrutura bipolar, isto é, uma planta rudimentar com um eixo raiz/caule, origina-se a partir de uma única célula e não mostra conexões vasculares com seu tecido maternal (HACCIUS, 1978). A principal variável controladora da embriogênese somática é o tipo e a concentração de auxina utilizada; a fonte de nitrogênio do meio de cultura é, também, um fator de grande relevância (BROWN & THORPE, 1986). O aparecimento de variantes somaclonais (LARKIN & SCOWCROFT, 1981) não parece ser comum nesta via de regeneração. Tal fato seria decorrente de uma forte pressão de seleção a favor das células normais durante este processo de regenera-

ção (Vasil, Swedlund & Vasil; citados por MORRISH *et alii*, 1987).

Suspensões celulares originadas de calos embriogênicos constituem uma fonte ideal para protoplastos (DIXON, 1985), os quais são da maior importância para o estabelecimento de sistemas para manipulação genética *in vitro*.

Por suas características, a embriogênese somática se mostra desejável quando o objetivo é a produção de mutantes sólidos e estáveis ou a clonagem de plantas geneticamente engenheiradas (D'AMATO, 1985). No entanto, são necessários estudos para se determinar o nível de estabilidade alcançado por esta via de regeneração em cada espécie.

A organogênese, por sua vez, caracteriza-se pela produção de um primórdio de gema, unipolar, que se desenvolve em um broto, o qual induz os feixes procambiais a estabelecer uma conexão condutora entre ele e o tecido maternal; a organogênese da raiz vem em sequência (HACCIUS, 1978).

A escolha do explante, a composição do meio de cultivo e o controle do ambiente físico são os fatores determinantes do sucesso desta via de regeneração. Os dados obtidos com diversos sistemas, indicam que a organogênese ocorre através da desdiferenciação de células do explante, as quais, formam centros meristemáticos precursores de raízes ou brotos; o acúmulo de amido está normalmente associado

a estas regiões onde os centros meristemáticos são formados (THORPE, 1980; BROWN & THORPE, 1986).

O conceito básico da regulação da organogênese fundamenta-se nas interações quantitativas entre os reguladores de crescimento, principalmente auxina e citocinina, como proposto por Skoog & Miller (citados por THORPE & MURASHIGE, 1970), além de outros metabólitos reguladores de todos os tipos de crescimento, incluindo a formação de órgãos (BURGESS, 1989).

A constante variabilidade apresentada por regenerantes via calo organogênico indicam uma origem multicelular dos mesmos, o que os torna uma fonte para a obtenção de variantes somaclonais (MORRISH *et alii*, 1987).

Em função da diversidade e complexidade dos fatores que controlam a embriogênese e a organogênese *in vitro*, estes processos continuam eminentemente empíricos (HALPERIN, 1986).

2.2.1. Cultura de tecidos na família Leguminosae

Entre as dicotiledôneas, a família Leguminosae apresenta-se como uma das mais recalcitrantes à regeneração *in vitro* (EVANS *et alii*, 1983; HAMMATT *et alii*, 1986).

No entanto, a partir da década de 70, os relatos de sucesso no cultivo *in vitro* de várias espécies desta família vêm aumentando (SAUNDERS & BINGHAM, 1972; SCOWCROFT & ADAMSON, 1976; PARROT & COLLINS, 1983; EAPEN & GILL, 1986;

BARWALE & WIDHOLM, 1990).

Tais relatos refletem um avanço no conhecimento dos requerimentos necessários para a expressão da totipotência de células e tecidos cultivados. De modo geral, as leguminosas produtoras de grãos são menos responsíveis *in vitro* do que as leguminosas forrageiras (HUYGHE, 1990).

A regeneração *in vitro* na família Leguminosae está condicionada a ação de três principais fatores: o genótipo da planta doadora, a origem e o estado fisiológico do explante e as condições químicas e físicas da cultura (HAMMATT *et alii*, 1986).

Os dados relativos a ação destes fatores vêm sendo obtidos principalmente de estudos realizados com alfafa (*Medicago sativa*), a leguminosa forrageira mais estudada sob o ponto de vista da cultura de tecidos, em função de sua importância econômica e responsividade (ARCIONI *et alii*, 1990).

Além do gênero *Medicago*, os gêneros *Trifolium* (WILLIAMS *et alii*, 1990) e *Stylosanthes* (MEIJER & SZABADOS, 1990), que também contêm espécies forrageiras de importância econômica, estão contribuindo grandemente para o avanço nestas novas abordagens biotecnológicas.

2.2.1.1. Genótipo

Em geral, as espécies do gênero *Medicago* são passíveis à embriogênese somática e à regeneração de plantas *in vitro* (SAUNDERS & BINGHAM, 1972; ARCIONI *et alii*, 1982; NAGARAJAN *et alii*, 1986; BROWN *et alii*, 1989).

O potencial genético de uma planta, no entanto, difere das demais e assim, muitas variações são encontradas nas respostas às manipulações *in vitro* (BROWN & ATANASSOV, 1985).

BINGHAM *et alii* (1975), trabalhando com diversas cultivares de alfafa, demonstraram que o caráter regeneração *in vitro* é altamente herdável e que, através de seleção recorrente aplicada a genótipos selecionados para este caráter, é possível se obter ganhos na ordem de 50%.

A herança quantitativa em alfafa, para este caráter pode estar sendo controlada por pelo menos dois genes dominantes (REISH & BINGHAM, 1980).

Tem sido demonstrado ainda que, a habilidade para a regeneração via embriogênese somática, a via mais comum de regeneração no gênero *Medicago*, está associada a bases genéticas específicas (MITTEN *et alii*, 1984; BROWN & ATANASSOV, 1985).

A seleção de genótipos com boa capacidade de regeneração *in vitro* já faz parte da rotina de qualquer programa de cultura de tecidos envolvendo espécies deste gênero (BROWN *et alii*, 1989); em relação a alfafa, afir-

ma-se que estes genótipos altamente regenerativos podem ser obtidos em todas as cultivares desde que um número suficiente de plantas seja avaliado (BINGHAN *et alii*, 1975).

A ação do genótipo sobre a regeneração *in vitro* não se restringe apenas à cultura de calos, mas é observada também em suspensões celulares e cultura de protoplastos (ORR *et alii*, 1985; DIJAK & BROWN, 1987).

No entanto, existem divergências entre os autores em relação a extensão da influência do genótipo sobre a regeneração *in vitro*. Sua frequência pode ser afetada por interações entre genótipo *x* meio de cultura (BROWN & ATANASSOV, 1985) e genótipo *x* explante (NOVAK & KONECNA, 1982; ARCIONI *et alii*, 1989). Porém, segundo CHEN *et alii* (1987) cultivares com alta capacidade regenerativa apresentarão respostas embriogênicas superiores independentemente do protocolo para meio de cultura ou fonte de explantes utilizados. Ainda, de acordo com estes autores, mesmo em cultivares com capacidade regenerativa menor, é possível se identificar genótipos altamente embriogênicos, com respostas que superam aquelas apresentadas pelos melhores genótipos das cultivares com alta capacidade regenerativa.

Atualmente, se procura em alfafa marcadores morfológicos que possam estar associados com a capacidade de embriogênese somática e regeneração *in vitro* (BROWN *et alii*, 1989).

Os estudos realizados no gênero *Trifolium* também mostram que o estabelecimento da cultura (período de

indução, taxa de crescimento), a habilidade na regeneração de brotos diretamente do meio de indução de calos sem a necessidade de transferência para um meio de regeneração, bem como, a via de regeneração, isto é, se embriogênese somática ou organogênese, são genótipo-dependentes, portanto altamente herdáveis, podendo responder ao melhoramento (KEYES *et alii*, 1980; WILLIAMS *et alii*, 1990).

Isto tem sido válido para culturas de calo, suspensão celular e de protoplastos (PHILLIPS & COLLINS, 1979; KEYES *et alii*, 1980; BHOJWANI & WHITE. 1982); cultura de brotos (OELCK & SCHIEDER, 1983; Campbell & Tomes, citados por WILLIAMS *et alii*, 1990) e resgate de embriões (PHILLIPS *et alii*, 1982). Para espécies de cruzamento aberto, tais como *Trifolium repens* (trevo branco) e *T. pratense* (trevo vermelho), onde existe grande variabilidade genética, mesmo que as manipulações *in vitro* sejam aplicadas a uma única cultivar, a avaliação de um grande número de genótipos poderá aumentar a taxa de sucesso em tais manipulações (PARROT & COLLINS, 1983; BHOJWANI *et alii*, 1984).

O gênero *Stylosanthes* tem se mostrado como um dos menos recalcitrantes em termos de regeneração *in vitro*; até o momento, nove espécies deste gênero já foram regeneradas a partir de culturas de calos derivadas de vários tipos de explantes (MEIJER & BROUGHTON, 1981; MROGINSKI & KARTHA, 1981; REY *et alii*, 1985; SZABADOS & ROCA, 1986).

A regeneração de plantas inteiras a partir da cultura de tecido em espécies deste gênero ocorre através da

organogênese de brotos; não existe nenhum relato na literatura da regeneração *in vitro* via embriogênese somática (MEIJER & SZABADOS, 1990).

MEIJER (1982) foi o primeiro a relatar o efeito de genótipos sobre a capacidade de regeneração *in vitro* no gênero *Stylosanthes*. Trabalhando com a espécie *S. guianensis* e utilizando vários tipos de explantes e protocolos de meio de cultura, ele observou diferenças no potencial morfogenético de culturas de calos de três cultivares australianos (cvs. Cook, Endeavour e Schofield), das quais a cultivar Cook mostrou-se o mais acessível às manipulações *in vitro*.

Posteriormente, GODWIN *et alii* (1987b), também encontraram diferenças genotípicas substanciais na frequência de regeneração a partir de culturas de calos em três cultivares (cvs. Graham, Endeavour, Oxley) e duas introduções (CPI 34911 e CPI 18750), da espécie *S. guianensis*.

Ainda na espécie *S. guianensis*, foram encontradas diferenças genótipo-específicas no potencial regenerativo de duas introduções colombianas (CIAT 136 e CIAT 2243), tanto em suspensões celulares quanto em culturas de protoplastos (SZABADOS & ROCA, 1986).

A ação do genótipo sobre a indução, frequência e duração ao longo do tempo da capacidade regenerativa, também tem sido relatada em culturas de calo da espécie *S. scabra* (GODWIN *et alii*, 1987a).

MANNERS (1987) observou extrema variabilidade na susceptibilidade de diferentes genótipos de *Stylosanthes* a infecção por *Agrobacterium tumefasciens* e alerta que este é um importante fator a ser considerado em espécies e cultivares quando se objetiva a obtenção de plantas transgênicas.

Embora a influência do efeito genótipo sobre a regeneração *in vitro*, no gênero *Stylosanthes*, não seja demonstrada com contundência tão grande como nos gêneros *Medicago* e *Trifolium*, os relatos acima não deixam dúvidas quanto a necessidade em se considerá-lo em qualquer abordagem *in vitro* a ser adotada.

Em *Lotus corniculatus*, outra importante leguminosa forrageira, o genótipo também é a variável mais crítica na determinação da taxa de crescimento e tipo de calo, bem como no número de plantas regeneradas por grama de calo. O tipo de explante, por outro lado parece exercer pouco efeito. A regeneração de plantas parece ser controlada por apenas poucos genes, e o melhoramento da responsividade à regeneração tem sido obtida através da seleção fenotípica (MARIOTTI *et alii*, 1984; Glover & Tomes, citados por SWANSON *et alii*, 1990).

A influência do genótipo sobre a indução, crescimento e diferenciação de culturas de células e tecidos tem sido relatada ainda em leguminosas produtoras de grãos, como *Cicer arietinum* (ALTAF & AHMAD, 1990), para aquelas pertencentes ao gênero *Glycine* (BARWALE & WIDHOLM, 1990) entre outras.

2.2.1.2. Variação somaclonal

A ocorrência de variação somaclonal tem sido registrada em diferentes espécies de leguminosas (ARCIONI *et alii*, 1989; MILES *et alii*, 1989; DAMIANI *et alii*, 1990).

Os mecanismos responsáveis pela variação somaclonal não estão definitivamente determinados, porém, as evidências obtidas principalmente de estudos da variação citológica em culturas *in vitro* e plantas regeneradas indicam que as condições genéticas e fisiológicas da fonte doadora do explante e as condições e duração das culturas, constituem os principais fatores que afetam sua ocorrência (LARKIN & SCOWCROFT, 1981; LEE & PHILLIPS, 1988; EVANS, 1989).

De acordo com MILES *et alii* (1989), a geração de variabilidade genética pela cultura de tecidos tem duas implicações importantes: 1) se esta variabilidade for ampla, a multiplicação de um dado genótipo via micropropagação não é confiável, diferentemente do que ocorre com os métodos tradicionais de propagação vegetativa; 2) a variabilidade originada a partir da cultura *in vitro*, pode ser uma fonte potencial de novos variantes genéticos de valor agronômico útil em programas de melhoramento de plantas.

Dados obtidos com *Medicago sativa* (ARCIONI *et alii*, 1989), *Lotus corniculatus* (DAMIANI *et alii*, 1990), *Stylosanthes guianensis* (GODWIN *et alii*, 1987a; MILES *et alii*, 1989) mostram que as variações obtidas em caracteres

morfológicos e agronômicos apresentam um componente de natureza genética, sendo a frequência e o tipo de variação observadas genótipo-específicas.

MILES *et alii* (1989) relatam variações negativas produzidas pela cultura de tecidos em *S. guianensis*: redução no número e tamanho dos ramos e internós, baixa produtividade de sementes e alta susceptibilidade à antracnose quando comparadas com as plantas testemunhas. Em vista dos resultados obtidos, os autores afirmam ser necessário um procedimento mais eficiente na seleção da variabilidade surgida para que a variação somaclonal possa ser efetivamente utilizada em programas de melhoramento e, desaconselham a propagação *in vitro* de genótipos de *S. guianensis*, sob as condições experimentais desenvolvidas em função da variabilidade gerada.

A necessidade de se melhorar os mecanismos de seleção da variabilidade originada *in vitro* também foi mencionada em estudos com *Medicago sativa* e *Lotus corniculatus*. O fato de a variação induzida pela cultura *in vitro* geralmente ter natureza deletéria, faz sentido quando esta variação é visualizada como um produto de alterações aleatórias ocorrendo em genótipos altamente evoluídos (Larkin, citado por MILES *et alii*, 1989).

Sob este ponto de vista é possível se estabelecer uma relação entre o efeito de genótipo sobre a capacidade de regeneração *in vitro* e a variação somaclonal.

Já foi mencionado anteriormente que as leguminosas produtoras de grãos investigadas apresentam capacidade de regeneração *in vitro* inferior a das leguminosas forrageiras. OELCK & SCHIEDER (1983) propõem como explicação para este fenômeno a reduzida variabilidade genética apresentada pelas variedades leguminosas produtoras de grãos, o que as torna, quando cultivadas *in vitro*, incapazes de se adaptar ao estresse que esta condição representa, demonstrando assim, um comportamento recalcitrante.

A estreita variabilidade genética seria resultante dos intensos ciclos de endocruzamento e seleção aos quais estas leguminosas foram submetidas ao longo de seus cultivos.

Os parentes selvagens das espécies cultivadas, por outro lado, apresentam uma ampla base genética e são de fato, mais responsíveis *in vitro*; é o observado, por exemplo, com as espécies *Glycine canescens* e *G. clandestina*, parentes selvagens da soja (*G. max*), as quais são regeneradas rotineiramente a partir de culturas de calos (Widholm & Rick; Grant; Hammatt *et alii*, citados por BARWALE & WIDHOLM, 1990).

Do mesmo modo, as leguminosas forrageiras por apresentarem sistemas de cruzamento aberto ou, quando autógamas, por não terem sido submetidas a intensos ciclos de seleção mantêm uma variabilidade genética alta e, consequentemente, uma probabilidade maior de conter genótipos propícios à regeneração *in vitro* (HAMMATT *et alii*, 1986).

LARK (1989) no entanto, usando como modelo a soja, uma leguminosa de autofecundação, há muito tempo cultivada e que exibe variabilidade genética, propõe uma explicação alternativa para o comportamento recalcitrante e/ou o aparecimento de variantes somaclonais degenerados , que não, a impossibilidade de responder ao estresse *in vitro* em consequência da falta de variabilidade genética.

Para este autor, materiais como a soja, que apresentam em seu genoma complexos multigênicos coadaptados evolutivamente, quando submetidos ao estresse fisiológico do cultivo *in vitro* podem sofrer mudanças nestes blocos gênicos e entrar em um estado de desequilíbrio genético.

O desequilíbrio genético provocado pelas condições da cultura impediria, então, a regeneração e/ou promoveria o surgimento de variantes degenerados.

As hipóteses levantadas por OELCK & SCHIEDER (1983) e por LARK (1989) não são mutuamente excludentes e, em ambos os trabalhos, os autores apontam a avaliação de um número maior de genótipos cultivados *in vitro* como possível solução para o comportamento recalcitrante e o aparecimento de variantes somaclonais indesejáveis.

2.2.1.3. Origem e estado fisiológico do explante

O explante, via de regra, é um complexo de células, as quais, variam quanto a capacidade de prolifera-

ção, nível de ploidia e estado fisiológico, portanto, apresentam diferentes sensibilidades aos estímulos impostos pelas condições de cultivo; isto se reflete muitas vezes em variações observadas entre explantes essencialmente similares cultivados em um meio definido (YEOMAN & FORCHE, 1980).

O ambiente químico e físico da cultura, assim como a manipulação deste, pode favorecer alguns tipos celulares levando a perpetuação de alguns e a eliminação de outros; os tipos mantidos, não são necessariamente aqueles com boa capacidade morfogenética (BURGESS, 1989).

Assim, a escolha do explante é um fator de grande importância na obtenção da regeneração *in vitro*. Diferentes autores (MURASHIGE, 1974; THORPE, 1980) têm discutido as variáveis consideradas nesta escolha: o órgão utilizado como fonte de explante, o estado fisiológico e ontogenético do órgão, a estação na qual o explante foi obtido, o tamanho do explante e a qualidade global da planta doadora do explante.

O nível hormonal endógeno do explante é um aspecto altamente relevante nesta questão. Grande parte dos conhecimentos atuais a este respeito foram obtidos em estudos com folhas jovens e os dados indicam que, todas as principais classes de hormônios, auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abcísico e etileno, estão presentes nesta estrutura; pouco se sabe, porém, a respeito das interações e efeitos que eles exercem sobre o desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* (BURGESS, 1989).

A utilização de explantes oriundos de plântulas recém germinadas em culturas axênicas (culturas assépticas) as quais, apresentam alto grau de uniformidade em seu estado fisiológico e potencial regenerativo e/ou de explantes relativamente homogêneos em relação aos tipos celulares que os compõem, como por exemplo, mesófilo foliar, câmbios vasculares, etc., são estratégias que permitem controlar algumas das variáveis citadas na escolha do explante (CHLYAH, 1974; TRAN THANH VAN *et alii*, 1974; YEOMAN & FORCHE, 1980).

Em leguminosas forrageiras, tecidos meristemáticos e imaturos respondem a indução mais rapidamente e regeneram mais eficientemente do que tecidos maturos e diferenciados (PHILLIPS & COLLINS, 1979; MEIJER, 1982; ORR *et alii*, 1985).

Existem ainda relatos neste grupo de leguminosas (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986) mostrando que determinadas respostas morfogenéticas *in vitro*, são limitadas pela influência exercida pelo estágio do ciclo de vida da planta a partir da qual o explante foi excisado.

O sucesso no isolamento e cultura de protoplastos tem se mostrado nas leguminosas, assim como em outros grupos de plantas, particularmente dependente da idade e do tipo de órgão utilizado como explante e das pré-condições da cultura (BHOJWANI & WHITE, 1982; HAMMATT *et alii*, 1986).

No gênero *Stylosanthes*, em particular, os explantes são obtidos basicamente de partes, tais como raiz,

cotilédones, hipocótilo e folhas (SCOWCROFT & ADAMSON, 1976; MEIJER & BROUGHTON, 1981; MANNERS, 1987) ou calos derivados destes (SZABADOS & ROCA, 1986).

Os explantes são obtidos de plantas cultivadas em casa de vegetação sob condições controladas (MROGINSKI & KARTHA, 1981; GODWIN *et alii*, 1987a) ou em culturas axênicas (MEIJER, 1982).

Explantes hipocotiledonares e foliares têm se mostrado os mais adequados para o cultivo *in vitro* (MEIJER & BROUGHTON, 1981; GODWIN *et alii*, 1987b). Hipocótilos são obtidos a partir de plântulas contando poucos dias após a germinação das sementes; folíolos são obtidos de plântulas com cerca de 30-40 dias após a germinação ou de folhas recém formadas em plantas maturas.

Não há dados sobre cultura de anteras, micrósporos, óvulos ou embriões, no gênero *Stylosanthes* (MEIJER & SZABADOS, 1990).

2.2.1.4. Condições químicas e físicas da cultura

O sucesso na regeneração de muitas espécies de plantas tem sido resultado de manipulações nas condições químicas e físicas do meio de cultura; a otimização destas condições representa o primeiro passo na aplicação de técnicas da cultura de tecidos (MURASHIGE, 1974).

THORPE (1980) discute estas condições e apresenta cinco classes principais de componentes químicos do meio de cultura necessários à indução de crescimento e regeneração *in vitro*: 1) macro e micronutrientes inorgânicos; 2) fonte de carbono (açúcar); 3) vitaminas; 4) nitrogênio orgânico e 5) reguladores de crescimento.

A indução e o estabelecimento de culturas de calos necessitam de fontes exógenas de substâncias reguladoras de crescimento (hormônios ou substâncias sintéticas quimicamente análogas a eles); as raras exceções a este princípio ocorrem em tumores e algumas espécies de *Citrus* (YEOMAN & FORCHE, 1980).

Skoog & Miller (citados por THORPE & MURASHIGE, 1970) observaram que interações quantitativas entre reguladores de crescimento estavam criticamente envolvidas na diferenciação e formação de órgãos a partir de calos. Estes autores demonstraram que valores altos para a relação citocinina/auxina promovem a diferenciação de meristemas caulinares em culturas de células somáticas de tabaco e valores baixos, a diferenciação de meristemas radiculares.

Posteriormente, Steward *et alii* (citados por BROWN & THORPE, 1986) desenvolveram um sistema *in vitro* com tecidos somáticos de cenoura, segundo o qual, a obtenção de embriogênese somática se dava simplesmente com a remoção da auxina sintética 2,4-D do meio de cultivo.

Estas duas técnicas distintas permanecem ainda hoje como as principais alternativas para se obter organiza-

ção de meristemas vegetais *de novo*, a partir de culturas de células e tecidos *in vitro*.

Os mecanismos de atuação das substâncias reguladoras de crescimento nos processos de indução e manutenção de calos, bem como, na diferenciação dos mesmos mantêm-se ainda grandemente desconhecidos.

WARREIN & PHILLIPS (1981) analisaram o mecanismo de ação dos hormônios vegetais em plantas intactas, enfocando-os sob os aspectos do crescimento e da divisão celular. No primeiro caso, parece bem estabelecido que as auxinas e outros hormônios podem causar mudanças nas propriedades mecânicas da parede celular vegetal, ou seja, aumentam a plasticidade das paredes celulares; existem contudo, muitas dúvidas em relação à cinética desta ação. Quanto a divisão, as auxinas poderiam estimular a síntese de DNA, porém esta síntese não seria, necessariamente, seguida pela mitose ou citocinese, as quais seriam reguladas pelas citocininas. Os mecanismos pelos quais uma auxina pode estimular a síntese de DNA permanecem desconhecidos.

Em plantas intactas, os principais sítios de produção de auxinas são as folhas jovens do ápice caulinar. A difusão destas auxinas é dependente da luz e ocorre no sentido ápice-base da planta; com a idade e consequente maturação da folha, o nível de auxina tende a decair na mesma (BURGESS, 1989).

De acordo com WILLIAMS *et alii* (1990) nas culturas *in vitro* o aumento no nível de auxina promove ao

mesmo tempo, um aumento na friabilidade e um decréscimo na diferenciação celular. A propriedade de friabilidade, isto é, a tendência das células agruparem-se e separarem logo após a divisão, presumivelmente envolve a ruptura dos contatos célula a célula, os quais, de outro modo, contribuem para a diferenciação mediada por contatos entre células vizinhas.

Auxinas sintéticas como o 2,4-D e NAA são mais estáveis do que as auxinas naturais como o IAA e, por isso, são mais frequentemente utilizadas nos meios de cultura (BURGESS, 1989).

Em relação as citocininas, está claramente demonstrado que elas atuam sobre a atividade mitótica (WANG *et alii*, 1981) bem como na diferenciação celular e regeneração de plantas (Feierabend, citado por SWANSON *et alii*, 1983).

Em plantas intactas, o local de síntese das citocininas parece ser a raiz, porém, há indícios de síntese e acúmulo em outros órgãos, como demonstrado em feijão (*Phaseolus vulgaris*) onde as folhas apresentam uma forma de zeatina da qual não se encontra vestígios na raiz (BURGESS, 1989).

Em cultura, determinadas células de um explante, devido aos seus níveis de plodia e/ou estágio em que se encontram de seus ciclos, podem ser mais susceptíveis às divisões dando origem a centros meristemáticos e posteriormente a nódulos de diferenciação, os quais, parecem desempe-

nhar importante papel no metabolismo das citocininas (KERBAUY *et alii*, 1988). No entanto, a adição de altas concentrações de citocinina no meio de cultura pode ter um efeito inibitório sobre os processos de crescimento e diferenciação de um calo (YEOMAN & FORCHE, 1980), chegando mesmo a causar o fenômeno da vitrificação (PHAN, 1991).

Estudos envolvendo uma linhagem de calo, mutante albino, em *Lotus corniculatus*, indicam que, no processo de inibição do citosol pelos altos níveis de citocinina, o plastídio deva ser o primeiro sítio de ação sobre o qual elas atuam (SWANSON *et alii*, 1983).

O gás etileno também atua sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas.

Em plantas intactas, o amadurecimento de frutos, ferimentos, estímulos mecânicos, aplicação de auxinas e herbicidas, etc. estão associados a mudanças na produção de etileno concomitantemente a modificações no crescimento e/ou desenvolvimento (Abeles, citado por HUXTER *et alii*, 1979).

HUXTER *et alii* (1979) verificaram que a produção de etileno em culturas de calos depende de fatores como, condição de luminosidade - a condição escuro contínuo determina as maiores produções - e idade da cultura, bem como, a existência de uma correlação altamente positiva entre a produção deste gás e a rapidez no crescimento do calo. As mudanças na produção de etileno estimuladas pelas condições da cultura, foram interpretadas por estes autores, como marcadores de alterações metabólicas ligadas ao

crescimento e/ou desenvolvimento do calo.

O etileno estimula a ocorrência de divisões celulares, as quais dão origem aos meristemóides, precursores dos primórdios caulinares no processo de organogênese (HUXTER *et alii*, 1981).

Ainda em cultura, atribui-se ao etileno efeitos como a formação de folhas menores que a de plantas controles e com tendência a um rápido amarelecimento; no entanto, sua participação ou de seu precursor, o ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano) no fenômeno da vitrificação está descartada (PHAN, 1991).

Todas as substâncias reguladoras de crescimento devem apresentar mecanismos, existentes em suas próprias vias metabólicas, que regulem suas concentrações no interior da célula. Quando em cultura, células e tecidos apresentam diferentes respostas às manipulações externas de substâncias reguladoras de crescimento, como por exemplo, o fenômeno da habituação.

O termo habituação refere-se a mudanças nos requerimentos nutricionais ocorridas em células em cultura, mudanças estas herdáveis e relacionadas principalmente a hormônios vegetais (DODDS & ROBERTS, 1985).

Culturas de calos apresentando o fenômeno da habituação caracterizam-se por prescindirem da suplementação externa de auxinas e citocininas para sua manutenção (YEOMAN & FORCHE, 1980).

A habituação em calos para citocinina pode estar relacionada com o processo de regeneração (KRAUS *et alii*, 1985; KERBAUY *et alii*, 1988).

Por outro lado, fatores como temperatura, umidade, luz (qualidade espectral, intensidade e fotoperíodo), consistência física do meio, tamanho do recipiente de cultivo, etc., fazem parte das condições físicas, e, juntamente com os procedimentos adotados na condução da cultura, isto é, a sequência de estímulos promovidos pelas substâncias reguladoras de crescimento, os intervalos nas transferências de meios, o volume de material repicado, completam o quadro dos determinantes da responsividade *in vitro*, extrínsecas ao explante (THORPE, 1980; YEOMAN & FORCHE, 1980).

A seguir serão apresentadas as condições determinantes da indução, crescimento e manutenção de culturas de calos, bem como a regeneração de plantas a partir destas culturas, em leguminosas forrageiras.

Em alfafa, diferentes meios basais são utilizados na indução de calos, tais como, B0i 2Y um meio Blaydes modificado cujo uso foi relatado por SAUNDERS & BINGHAM (1972); meio B5 relatado por ATANASSOV & BROWN (1984); meio MS relatado por LUPOTTO (1983); meio SH relatado por WALKER *et alii* (1979) e meios mais complexos como o relatado por NOVÁK & KONECNA (1982).

A indução do calo, no entanto, só é alcançada com a suplementação do meio basal com uma fonte exógena de auxina, em combinação ou não com uma citocinina (EVANS *et*

alii, 1983; ARCIONI *et alii*, 1990).

A auxina sintética 2,4-D nesta espécie, tem se mostrado a mais efetiva no processo de indução de calo, promovendo não apenas a manutenção e crescimento deste, como também influenciando sua posterior morfogênese (SAUNDERS & BINGHAM, 1975; WALKER *et alii*, 1979; ARCIONI *et alii*, 1989).

Outra auxina sintética, o NAA, embora também se mostre efetiva na indução de calos não parece ser essencial à indução de gemas (WALKER *et alii*, 1979).

Uma fonte exógena de citocinina, por outro lado, não é imprescindível à indução de calo. Porém, estudos desenvolvidos por WALKER *et alii* (1979), demonstram que sua presença no meio de indução é essencial para o direcionamento da organogênese no sentido de haver formação de brotos (alta concentração de 2,4-D e baixa concentração de KIN) ou de raiz (baixa concentração de 2,4-D e alta concentração de KIN). As citocininas KIN e BAP têm sido amplamente utilizadas no cultivo *in vitro* de leguminosas (EVANS *et alii*, 1983; HAMMATT *et alii*, 1986).

As concentrações requeridas de 2,4-D ou NAA e KIN ou BAP para a indução de calos em alfafa estão na faixa de 0,5-2,0 mg/l e 0,1-0,5 mg/l, respectivamente (ARCIONI *et alii*, 1990).

Os calos induzidos sob estas condições são geralmente friáveis e de crescimento rápido; o período de indução dos mesmos é variável, de acordo com a concentração de 2,4-D utilizada (WALKER *et alii*, 1979; BROWN & ATANASSOV,

1985).

O fator luz não parece exercer resultados muito pronunciados sobre o resultado final da indução; calos têm sido induzidos sob luz contínua (SAUNDERS & BINGHAM, 1975); fotoperíodo de 16h luz/8h escuro (WALKER *et alii*, 1979; LUPOTTO, 1983) ou outros regimes de luminosidade (Kao & Michayluk, citados por ARCIONI, 1990).

A propagação de calos na presença de 2,4-D, em alguns casos parece particularmente sensível a composição do meio basal (LUPOTTO, 1983).

A regeneração do calo, organogênico ou embriogênico, induzido na presença do 2,4-D se dá com a transferência deste para um meio basal livre de fitorreguladores ou suplementado com uma fonte de citocinina (HAMMATT *et alii*, 1986; ARCIONI, 1990).

No caso específico da embriogênese somática a formação de embriões no calo tem sido estimulada por vários compostos orgânicos e inorgânicos (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986).

De acordo com ARCIONI *et alii* (1990), a manutenção do potencial regenerativo por períodos longos ou curtos, em culturas de calos de alfafa, é altamente dependente do genótipo.

Os meios basais utilizados na indução de calos em espécies pertencentes ao gênero *Trifolium* são MS, B_5, SH e L_2, como relatado por PHILLIPS & COLLINS (1979) suplementados com auxinas e citocininas.

Diversos reguladores de crescimento têm se mostrado efetivos na indução de calos embriogênicos ou organogênicos de ***Trifolium*** spp. O 2,4-D (0,1 a 2,0 mg/l) juntamente com KIN (0,04 a 2,0 mg/l) são os mais utilizados; a auxina sintética NAA (0,5 a 2,0 mg/l) também tem sido usada isoladamente ou em conjunto com o 2,4-D; a KIN eventualmente é substituída pelo 2iP (1 a 2 mg/l) ou BAP (0,5 mg/l); a combinação PIC (0,06 mg/l) mais BAP (0,1 mg/l) é aplicada particularmente a ***T. pratense*** ou às espécies altamente aparentadas (PHILLIPS & COLLINS, 1984).

De acordo com WILLIAMS ***et alii*** (1990), os calos induzidos apresentam frequentemente uma grande variedade de fenótipos morfológicos. Eles podem ser leves e friáveis, pesados e compactos ou viscosos; de coloração branca, amarela ou verde e podem conter células diferenciadas, particularmente elementos vasculares. O fenótipo e a homogeneidade dos calos podem geralmente ser controlados pelo ajuste de substâncias reguladoras de crescimento.

Ainda, segundo estes autores, a otimização do meio basal para as espécies envolvidas e um balanço suficientemente alto entre auxina e citocinina em termos de atividade biológica, parecem ser os grandes fatores determinantes do sucesso na indução de calos de ***Trifolium*** spp.

Uma vez induzido, o calo é subcultivado regularmente sobre o mesmo meio basal utilizado na indução ou sobre um meio de indução modificado onde o balanço entre auxina e citocinina pode ser diminuído ou aumentado

(PHILLIPS & COLLINS, 1984).

A regeneração de plantas a partir de culturas de calos ocorre via organogênese ou embriogênese somática; esta última é induzida em meio contendo 2,4-D (PHILLIPS & COLLINS, 1979, 1984; PARROT & COLLINS, 1983).

Subcultivos de calos após a iniciação de brotos ou embrióides fazem-se necessários para a obtenção em primeiro lugar do alongamento de brotos e, subsequentemente do enraizamento dos brotos alongados. O alongamento dos brotos é promovido por altos valores na relação citocinina/auxina e o enraizamento, por altos níveis de auxina que não o 2,4-D, ou em meio basal livre de hormônios e com concentrações de sais minerais reduzidas (PHILLIPS & COLLINS, 1984; WILLIAMS *et alii*, 1990).

WEBB *et alii* (1987) estudando a morfogênese *in vitro* no gênero *Trifolium*, inocularam explantes oriundos de plântulas de 72 espécies sobre os meios basais MS e B5, suplementados com 3% de sacarose, 0,5 mg/l de NAA e 0,5 mg/l de BAP. Explantes de 32 espécies formaram apenas calos sob estas condições, no entanto, explantes das 40 espécies restantes foram capazes de formar brotos e/ou raízes. Os dados indicam que mais estudos como estes são necessários para se detectar neste gênero, materiais com capacidade de regeneração em condições simplificadas de cultivo.

Calos de *Lotus corniculatus* são usualmente induzidos e mantidos sobre o meio basal B5 suplementado com 1 mg/l de 2,4-D, em temperaturas ao redor de 25°C, sob

fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, e intensidades luminosas variando entre 100-200$\mu E/m^2/s$ (SWANSON *et alii*, 1990).

Os calos induzidos sob estas condições apresentam grande diversidade entre e dentro cultivares no que diz respeito a cor, taxa de crescimento e textura, podendo manter o potencial morfogenético por vários anos em cultura (MARIOTTI *et alii*, 1984).

A regeneração é facilmente obtida e ocorre via embriogênese somática ou organogênese; devido a grande influência exercida pelo genótipo sobre a responsividade *in vitro* aliada ao fato desta espécie ter uma variabilidade genética extremamente ampla, a otimização das condições da cultura deverão ser feitas para genótipos específicos (SWANSON *et alii*, 1990).

Segundo SATOR (1990), os meios basais utilizados na indução de calos no gênero ***Lupinus*** (tremoço) são L_5, B_5 e MS, os quais devem ser suplementados com auxina, preferencialmente 2,4-D se o objetivo for o calo em si mesmo, ou NAA, se a regeneração de plantas é o objetivo final; a indução se dá no escuro, em temperaturas ao redor de 25°C. A regeneração neste gênero ocorre via de regra por organogênese indireta, e pressupõe, a subcultura dos calos induzidos em um meio próprio para regeneração, no qual, a relação citocinina/auxina deve ser alta; a fonte de citocinina mais efetiva parece ser o BAP; o enraizamento se dá no meio de regeneração livre de citocinina. A redução nas concentrações dos componentes do meio basal também melhora o enraizamento

in vitro (SATOR, 1985).

A indução de calos no gênero *Stylosanthes* ocorre em meio MS suplementado com auxina e citocinina conjuntamente (MEIJER, 1982; MEIJER & SZABADOS, 1990).

A utilização no meio de indução de calo dos reguladores 2,4-D ou NAA e BAP ou KIN, os mais efetivos para este gênero, favorecem não apenas o crescimento do calo, como também a diferenciação de gemas e/ou brotos e raízes, demonstrando que nesta fase da cultura os primeiros eventos para a regeneração já tiveram início (SCOWCROFT & ADAMSON, 1976; MROGINSKI & KARTHA, 1981; MEIJER & BROUGHTON, 1981; MEIJER, 1982; GODWIN *et alii*, 1987a,b).

A resposta morfogenética pode ser controlada pelo balanço de reguladores de crescimento no meio de cultivo. Quando o objetivo é a obtenção de calos com gemas caulinares, o valor do balanço auxina/citocinina deve ser baixo; para a manutenção de calos indiferenciados médio, em torno de 1; e para a rizogênese, o balanço deve ser alto (MROGINSKI & KARTHA, 1981; GODWIN *et alii*, 1987a; MEIJER & SZABADOS, 1990).

Estas respostas são válidas quando os calos são cultivados na luz, comumente em fotoperíodo de 16h luz/8h escuro; se a indução e manutenção ocorrer em escuro contínuo, a diferenciação é rara e apenas rizogênese será obtida (MEIJER & BROUGHTON, 1981; MEIJER, 1982; PEREIRA-NETO *et alii*, 1987).

A variabilidade fenotípica de calos cultivados na luz é grande, mas assim como no gênero *Trifolium* spp, é possível obter uma maior homogeneidade através de manipulações nos reguladores de crescimento (MROGINSKI & KARTHA, 1981; MEIJER, 1982; GODWIN *et alii*, 1987b).

As temperaturas sob as quais as culturas de calos são induzidas e mantidas variam entre 22 a 28°C (MEIJER, 1984).

Como verificado em alfafa, o gênero *Stylosanthes* também requer uma sequência de meios e estímulos promovidos pelas substâncias reguladoras de crescimento para que a regeneração de plantas inteiras ocorra (MROGINSKI & KARTHA, 1981; GODWIN *et alii*, 1987a).

A organogênese de brotos é obtida em sequência a indução de calos, em um meio contendo os mesmos reguladores de crescimento usados na fase anterior, porém, com um aumento na proporção de citocinina em relação a auxina ou omissão total da fonte de auxina do meio de cultivo. Enquanto a citocinina, particularmente BAP, claramente promove a organogênese de brotos, a auxina inibe-a e estimula a produção de raiz (MEIJER & SZABADOS, 1990).

Em *S. guianensis*, duas semanas após a transferência de calos induzidos para o meio de regeneração no caso de explantes hipocotiledonares e três semanas no caso de explantes foliares, já é possível observar a regeneração de numerosos brotos (MEIJER & BROUGHTON, 1981).

A transferência de brotos regenerados para meio MS com concentrações de sais, vitaminas e sacarose reduzidas à metade ou a um quarto e sem reguladores de crescimento propicia o alongamento e enraizamento dos brotos regenerados; o enraizamento pode ainda ser melhorado com a adição de IBA ao meio basal reduzido (MEIJER & SZABADOS, 1990).

Culturas de calos de várias espécies de *Stylosanthes* são capazes de manter seu potencial morfogenético por longos períodos (SCOWCROFT & ADAMSON, 1976; MEIJER, 1984; Mroginski & Kartha, citados por MEIJER & SZABADOS, 1990).

Em *S. guianensis*, culturas de calos podem se tornar auxina-autotróficas depois de um prolongado período de cultivo *in vitro*, na presença de luz; linhagens com esta característica apresentam capacidade regenerativa reduzida (MEIJER, 1984).

De modo geral, as concentrações dos reguladores de crescimento utilizados variam entre 0 a 2,0 mg/l de acordo com a natureza química dos fitorreguladores e a etapa do procedimento (indução de calos, regeneração de brotos ou enraizamento de brotos regenerados). Altas frequências de regeneração de brotos foram obtidas em meio de regeneração suplementado apenas com 1,0 mg/l de BAP, nas espécies *S. guianensis* (MROGINSKI & KARTHA, 1981; MEIJER & BROUGHTON, 1981) e *S. humilis* (MEIJER, 1982) ou 2,0 mg/l de BAP, nas espécies *S. scabra* (GODWIN *et alii*, 1987b) e *S. guianensis* (GODWIN *et alii*, 1987a).

A espécie *S. guianensis* parece ter potencial de regeneração de brotos a muitos valores da relação auxina/citocinina (MEIJER & BROUGHTON, 1981; MROGINSKI & KARTHA, 1981; Meijer, citado por MEIJER, 1982).

Estudos têm mostrado a interação existente entre a forma e a concentração dos reguladores de crescimento e os genótipos testados (GODWIN *et alii*, 1987a,b).

Plântulas regeneradas podem ser transferidas para o solo com taxas de sobrevivência de 50 a 70%; recomenda-se a manutenção destas em temperaturas entre 28 a 30°C e alta umidade relativa durante o período de transição *in vitro* para *in vivo* (MEIJER, 1984).

2.2.2. Avanços da cultura de tecidos no gênero *Stylosanthes*

As técnicas da cultura de tecidos podem ter as seguintes aplicações práticas em programas de melhoramento no gênero *Stylosanthes*:

1. obtenção de híbridos somáticos entre espécies sexualmente incompatíveis;

2. obtenção de plantas transgênicas, isto é, plantas com genes exógenos, codificadores de caracteres agronômicos desejáveis, inseridos em seus genomas;

3. obtenção de variantes somaclonais, com variabilidade genética desejável do ponto de vista agronômico;

4. clonagem de genótipos selecionados;

5. rápida produção de linhas homozigotas facilitando e acelerando a obtenção de híbridos;

6. resgate de embriões obtidos do cruzamento entre espécies parcialmente compatíveis do ponto de vista sexual.

De um modo geral, estas aplicações para se tornarem viáveis, dependem em maior ou menor grau do desenvolvimento da tecnologia da cultura de protoplastos; esta é, portanto, a grande prioridade das pesquisas no campo da cultura de tecidos em *Stylosanthes* (MEIJER & SZABADOS, 1990).

O primeiro relato de sucesso na regeneração de plantas a partir de protoplastos, isolados de suspensões celulares de *S. guianensis*, foi feito por MEIJER & STEINBISS em 1983, porém a eficiência de plantas regeneradas em relação ao número de protoplastos cultivados inicialmente, foi baixa.

Três anos depois, novo relato de sucesso na obtenção de regenerantes a partir da cultura de protoplastos ocorre na espécie *S. guianensis* (SZABADOS & ROCA, 1986); os protoplastos neste estudo foram isolados de suspensões celulares e mesofilo foliar. De acordo com os autores, a eficiência alcançada na regeneração foi similar ou pouco superior àquela observada por Meijer & Steinbiss, anteriormente.

VIEIRA *et alii* (1990) relatam, então, a regeneração de plantas a partir de protoplastos isolados de cotilédones de plântulas germinadas *in vitro* nas espécies *S. guianensis* (cultivares Bandeirante e IRI-1022), *S. macroce-*

phala e *S. scabra*. Este estudo representa um avanço em relação aos anteriores não apenas por ter aperfeiçoado alguns aspectos relativos ao meio de cultura, reguladores de crescimento e técnicas de cultivo, o que se refletiu em um aumento na eficiência de regeneração, mas também por ter demonstrado a viabilidade de regeneração de plantas a partir de protoplastos em outras espécies do gênero.

No entanto, há muito a ser avançado na tecnologia de protoplastos neste gênero, pois, somente quando a fusão de protoplastos e a consequente regeneração de plantas for possível é que a hibridização somática poderá se concretizar (MEIJER & SZABADOS, 1990).

A obtenção de plantas transformadas geneticamente é também altamente dependente de protocolos otimizados para culturas de protoplastos. Entretanto, a abordagem que vem sendo aplicada na obtenção de plantas geneticamente engenheiradas no gênero *Stylosanthes* não utiliza protoplastos, e sim, o co-cultivo de pequenos fragmentos de folhas e caules com linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* (MANNERS, 1987, 1988; MANNERS & WAY, 1989).

Em estudos envolvendo as espécies *S. guianensis*, *S. humilis* e *S. hamata* ficou demonstrado que o gênero *Stylosanthes* é susceptível a infecção por *A. tumefaciens* (MANNERS, 1987) e que plantas transgênicas de *S. humilis* podem ser obtidas usando uma linhagem de *A. tumefaciens* desarmada e um vetor intermediário integrado ao T-DNA (MANNERS, 1988). A frequência de plantas transformadas utilizando-se

esta metodologia, no entanto, foi extremamente baixa, apenas 0,3% dos explantes inoculados.

MANNERS & WAY (1989) relatam um sistema de transformação e regeneração na espécie *S. humilis* com a utilização da bactéria *A. rhizogenes*, a qual, induz a formação de raízes no explante e concomitantemente a transformação destas, em uma frequência de 86%. Brotos transformados e regenerados a partir destas raízes são obtidos em uma frequência de 23%. Tal método mostrou-se mais eficiente do que o relatado anteriormente.

Embora os dados sejam promissores, não há indicios de que a curto ou mesmo a médio prazo se consiga plantas transformadas para caracteres agronomicamente desejáveis.

Vários autores têm relatado a ocorrência de variação somaclonal no gênero *Stylosanthes*.

MEIJER (1984) observou considerável variação em relação a morfologia e vigor entre plantas regeneradas a partir de culturas de calos após dois anos de cultivo, na espécie *S. guianensis*. Estes regenerantes apresentaram anormalidades no tamanho e forma das folhas, espessura do caule, comprimento do internó, aparente ausência de dominância apical em combinação com a formação excessiva de brotos laterais. Tais anormalidades persistiram quando as plantas que as apresentavam foram propagadas por estaquias. Nenhuma avaliação acerca da base genética ou da transmissão sexual destas variações foi realizada.

GODWIN *et alii* (1987a) relatam um estudo sobre a herdabilidade e base genética da variação somaclonal envolvendo a espécie *S. guianensis*. Foi verificado através deste estudo que, grande parte da variação gerada pela cultura de calos não foi evidente na geração SC_1 devido a sua natureza recessiva; a geração SC_2 permitiu uma avaliação mais confiável do fenômeno. A base genética da variação pareceu ser mendeliana simples cujo efeito foi a geração de isolinhas diferindo em um caráter, a partir dos tipos parentais. Estes mesmos autores, ainda em 1987(b), relatam variações quanto a fertilidade e morfologia em estudos preliminares com regenerantes SC_1 de *S. scabra*.

Exceto as diferenças no florescimento, as variações tiveram pouco ou nenhum valor agronômico.

Posteriormente, novo relato de variação foi feito para a espécie *S. guianensis* (MILES *et alii*, 1989). De acordo com os autores, o maior efeito da cultura de calos observado, foi a indução de variantes tetraplóides. Os tetraplóides diferiram fenotipicamente dos diplóides além de apresentarem uma menor produção de semente. A observação feita anteriormente por GODWIN *et alii* (1987a) em relação ao fato da geração SC_2 ser mais adequada à avaliação da variação observada, confirma-se neste estudo.

Assim como já verificado em outros estudos, as variações obtidas tiveram pouco valor ou foram negativas do ponto de vista agronômico - baixa produção de sementes, maior susceptibilidade à antracnose quando comparada com o

controle, etc. - levando os autores a concluir que, a variação somaclonal poderá ser útil ao melhoramento da espécie *S. guianensis* somente onde a geração desta variação puder estar ligada a mecanismos de seleção altamente eficientes.

Esta conclusão será provavelmente aplicável a qualquer espécie do gênero *Stylosanthes* onde se queira explorar a variação somaclonal.

A obtenção de linhas homozigotas e/ou resgate de embriões através da cultura de tecidos, talvez sejam os eventos que mais demorem a ocorrer no gênero *Stylosanthes* visto não existir até o momento, nenhum relato de cultura de anteras, micrósporos, óvulos ou embriões para o mesmo (MEIJER & SZABADOS, 1990).

A facilidade na manipulação e a responsividade *in vitro* observadas em relação ao gênero *Stylosanthes*, não apenas contribuem para o alcance dos objetivos relacionados com o melhoramento desta cultura, como também, o torna um sistema modelo para estudos básicos no campo do desenvolvimento e diferenciação de plantas.

2.2.3. Estudos cito-histológicos da morfogênese *in vitro*

A célula vegetal, mesmo matura e diferenciada é capaz de regredir a um estágio meristemático desde que apresente sistema de membranas e núcleo viáveis; a este fenômeno dá-se o nome de desdiferenciação (BHOJWANI & RAZ-

DAN, 1983).

No contexto da cultura de tecidos, o fenômeno da desdiferenciação pode levar a formação de uma massa de células parenquimáticas, altamente desorganizada e proliferada, denominada calo (DODDS & ROBERTS, 1985) o qual, posteriormente pode ser induzido a rediferenciar-se, isto é, a formar células especializadas, tecidos e órgãos *de novo* (BURGESS, 1989).

Assim, a característica mais importante de um calo do ponto de vista funcional é que, embora represente uma proliferação anormal de células, ele tem o potencial para desenvolver raízes, brotos e embrióides normais, os quais por sua vez, podem originar plantas inteiras (DODDS & ROBERTS, 1985).

O calo é portanto um sistema que serve não apenas para a exploração de produtos e propagação de plantas, como também para estudos de desenvolvimento e diferenciação destas.

As características gerais de crescimento de um calo envolve uma complexa relação entre o material botânico usado como explante e as condições químicas e físicas da cultura (THORPE, 1980).

O principal fator responsável pela iniciação e estabelecimento de um calo é a acentuada mudança no ambiente químico dos constituintes celulares, mudança esta promovida por injúrias mecânicas (ferimentos) e/ou adição de substâncias estimuladoras de crescimento, as quais, deses-

truturam a organização celular (YEOMAN & FORCHE, 1980).

Do ponto de vista anatômico, a sequência do desenvolvimento de um calo levando a formação de brotos, organogênese de parte aérea, tem sido estudada de modo bastante completo em seus aspectos particulares e gerais em calos de tabaco (THORPE & MURASHIGE, 1970; ROSS *et alii*, 1973; Maeda & Thorpe, citados por THORPE, 1980).

Em seus estudos envolvendo calos de tabaco, THORPE & MURASHIGE (1970) descreveram a composição celular típica deste sistema: células parenquimáticas, altamente vacuoladas, com núcleo e citoplasma inconspícuos e elementos do xilema distribuídos aleatoriamente. Por volta do oitavo dia de cultura, foi relatado por estes autores, o aparecimento de zonas preferenciais de divisão celular na massa de células do calo; a partir destas regiões, centros meristemáticos ou meristemóides foram originados após 13 dias de cultura.

O termo meristemóide foi atribuído por Torrey (citado por THORPE & MURASHIGE, 1970) a massas esféricas constituídas por células meristemáticas pequenas e isodiamétricas. Estas células têm citoplasma e núcleo densos e parede celular fina; o núcleo ocupa grande parte do citoplasma. A nível de microscopia fotônica estas células parecem não vacuoladas.

Ainda segundo THORPE & MURASHIGE (1970), a partir destes meristemóides, primórdios e posteriormente brotos, foram formados. Do ponto de vista histoquímico,

estes autores chamam atenção para o acúmulo de amido nas células da zona preferencial de divisão no período que antecede a formação dos meristemóides e, propõem que este carboidrato deva funcionar como fonte energética para os processos de diferenciação e crescimento do broto.

Posteriormente ROSS *et alii* (1973) confirmaram a existência de zonas preferenciais de divisão celular em calos de tabaco, e, o desenvolvimento de meristemóides, os quais, foram encontrados em diferentes estágios, no período de 8 a 10 dias de cultura.

As fases iniciais do desenvolvimento do broto foram completadas por volta de 12 dias e, com 14 dias de cultura, o processo da organogênese havia prosseguido pelo menos até o estágio de primórdio ou então, brotos já estavam formados. O fato de as células oriundas de zonas preferenciais de divisão manterem-se menores, segundo estes autores, pode representar um pré-requisito essencial à formação de primórdios caulinares ou radiculares.

O estudo realizado por estes autores a nível de microscopia eletrônica revelou que, as células que formam os meristemóides apresentam vacúolos, porém, estes são pequenos e se distribuem na periferia celular; são células tipicamente meristemáticas, o que dá subsídios à ocorrência do fenômeno da desdiferenciação.

CHLYAH (1974) demonstrou o potencial morfogenético de diferentes tecidos excisados de segmentos de caule de *Torenia fournieri*. A epiderme juntamente com 1 a 7

camadas de parênquima subepidérmico, mesmo sem tecido vascular, apresentam potencial de proliferação. Calos formaram-se a partir da camada subepidérmica em contato com o meio de cultura. Duas a três semanas após o início da cultura, dependendo do número de camadas parenquimáticas acompanhando a epiderme, o primeiro primórdio de gema foi observado. Neste estudo, demonstrou-se também a diferenciação de traqueídes durante a formação de gemas. Divisões periclinais e oblíquas foram observadas em certos locais do parênquima subepidérmico. Estas divisões acentuaram-se por volta do quarto dia de cultura dando origem a fileiras de células afiladas. No sexto dia de cultura e na sequência deste, numerosas células formadas por esta região neocambial, diferenciaram-se em traqueídes.

Organogênese em calos derivados de cotilédones de *Pinus radiata* é relatada por PATEL & THORPE (1984). Neste processo, meristemóides ou nódulos de diferenciação desenvolveramse entre 10-12 dias na superfície do cotilédone, em contato com o meio de cultura; por volta de 21 dias, primórdios de gema foram detectados. Segundo estes autores, mesmo entre as células da epiderme e camadas da subepiderme em contato com o meio de cultura, provavelmente apenas algumas poucas células-alvo são sensíveis ao estímulo das substâncias reguladoras de crescimento. Isto está de acordo com os níveis de bloqueios listados por HALPERIN (1986) para explicar o comportamento recalcitrante de alguns materiais quanto a regeneração *in vitro* e com os requerimentos propos-

tos por THORPE (1980) para que uma célula vegetal expresse sua totipotência.

PATEL & THORPE (1984), estabeleceram ainda, embasados em seu sistema de estudo e em outros, que a citocinina BAP adicionada na cultura, media uma cadeia específica de eventos nas células-alvo que leva à divisão celular organizada e subsequentemente à formação de brotos.

Ainda em calos originados de cotilédones de *Pinus radiata*, VILLALOBOS *et alii* (1985), verificaram que estruturas organizadas desenvolvem-se a partir de algumas poucas células de uma única camada de células subepidérmicas em contado com o meio de cultura contendo BAP, as quais, começaram a dividir-se periclinalmente após o terceiro dia de cultura. As células-filhas por volta do quinto dia de cultura dividiram-se anticlinalmente e formaram um aglomerado de 6-8 células. Este aglomerado celular foi denominado pelos autores de promeristemóides. Os promeristemóides deram origem aos meristemóides por volta do décimo dia de cultura.

Assim como a formação de meristemóides, o acúmulo e a utilização de amido durante a organogênese *in vitro* parece ser um fenômeno de ocorrência geral (THORPE & MURASHIGE, 1970; ROSS *et alii*, 1973; THORPE, 1980).

O fato de estruturas organizadas surgirem na superfície em contato com o meio revela que esta posição deva ser influenciada pelos gradientes fisiológicos dos constituintes do meio de cultura (Ross & Thorpe, citados por ROSS *et alii*, 1973; VILLALOBOS *et alii*, 1985).

Além de citocininas, o gás etileno também parece desempenhar importante papel na organogênese de brotos.

HUXTER *et alii* (1981) trabalhando com segmentos de caule de tabaco, verificaram o aparecimento de zonas preferenciais de divisão celular na porção inferior do explante em proliferação em contato com o meio de cultura, por volta do sétimo dia de cultivo; estas regiões, no entanto, não foram detectadas antes do quinto dia de cultura, período que coincide com uma ação inibitória das taxas endógenas e exógenas do etileno sobre o processo organogenético. Meristemóides surgiram nas zonas preferenciais de divisão, por volta do nono dia de cultivo. O tecido tornou-se nodular, com o primórdio do broto começando a emergir entre os dias 9-10, porém mais comumente aos 12 dias. O processo não se mostrou sincrônico, como verificado préviamente por ROSS *et alii* (1973), pois todos os estágios de desenvolvimento do meristemóide e primórdio podem ser encontrados no mesmo calo no período de 6-14 dias. Este segundo período do processo da organogênese estaria correlacionado com o aumento nas taxas endógenas e/ou exógenas de etileno.

MONACELLI *et alii* (1988) realizaram um estudo acerca do padrão de desenvolvimento dos brotos em calos derivados de cotilédones de tomate onde discutem as implicações que a gênese multicelular de brotos pode ter para os programas de melhoramento genético envolvendo plantas regeneradas a partir do cultivo *in vitro*.

Foi verificado neste estudo que as primeiras divisões celulares levando a desdiferenciação e crescimento do calo ocorrem no parênquima do floema das nervuras principal e secundárias de materiais com 3 dias de cultura *in vitro*.

Entre 3 e 5 dias de cultura, o parênquima abaxial do floema, parênquima do xilema e as células do periciclo das nervuras principal e secundárias entram em divisão. Neste período, o crescimento do calo começa a romper o padrão estrutural dos feixes pela separação dos elementos vasculares. Nos dias que se seguem, cordões neocambiais ligam o xilema das nervuras principal e secundárias à superfície do calo. Estes cordões neocambiais diferenciam ainda traqueídes de transfusão ou ligam-se aos centros meristemáticos superficiais.

No terceiro dia de cultura, divisões celulares também foram observadas na epiderme superior e em algumas células do parênquima paliçadico levando à formação de pequenos grupos meristemáticos; no entanto, não se detectou domos ou brotos cuja origem tenha se dado a partir destes grupos meristemáticos.

A diferenciação de brotos ocorreu assincronicamente, tendo início no quinto dia de cultura com a divisão de umas poucas células de um cordão neocambial diferenciado no interior da região superficial do calo. A divisão de grupos de 2 a 4 destas células iniciais, levaram a formação de zonas de intensa atividade meristemática a par-

tir das quais, não apenas brotos, mas também pêlos glandulares diferenciaram-se.

Os brotos foram formados pelo desenvolvimento de um domo vegetativo; as células externas de cada domo dividiram-se anticlinalmente produzindo uma camada celular que se constitue na túnica do futuro ápice. Os meristemas com túnica nem sempre foram superficiais, em alguns casos, eles estavam inseridos na massa celular do calo. Domos podem ser considerados sistemas heterogêneos cujas áreas possuem potencialidades ontogenéticas específicas que são expressas na formação de caule e produção de folhas.

Embora as condições da cultura não tenham favorecido o processo de rizogênese, MONACELLI *et alii* (1988) relatam a ocorrência esporádica de raízes no calo cotiledonar durante a primeira semana de cultivo.

Análises histológicas mostraram que as raízes emergem dos calos na região da nervura central. As primeiras divisões levando à formação do meristema radicular, ocorreram em células do parênquima abaxial do floema.

Resultados similares foram obtidos por Coleman & Greyson (citados por MONACELLI *et alii*, 1988) para o desenvolvimento de raízes em explantes foliares de tomate.

Os autores concluem ao final deste estudo que os brotos não têm origem unicelular, o que está de acordo com várias linhas de evidência sobre a origem multicelular de brotos adventícios originados *in vitro* (D'AMATO, 1985).

Ainda de acordo com MONACELLI *et alii* (1988) a origem multicelular dos brotos, pode levar ao quimerismo na primeira geração de plantas regeneradas caso ocorra mutação em algumas destas células. No entanto, os relatos de ocorrência de quimerismo em tomate são raros, o que é explicado pelo pequeno número de células que iniciam a formação do broto. As mutações ocorridas no início do desenvolvimento deste, atingirá a todas as células iniciais, dando origem então a mutantes sólidos.

BROWN & THORPE (1986) reunindo dados de vários estudos afirmam conclusivamente que, os centros meristemáticos ou meristemóides podem aparentemente ser formados de uma ou várias células; no entanto, em todos os casos, uma atividade localizada de divisão celular levando a organização dos mesmos se faz presente e portanto, esta deve ser a via histológica geral da formação do primórdio caulinar.

A maioria dos estudos de diferenciação em cultura, referem-se não apenas a organogênese mas também, a especialização de determinados tipos celulares.

A especialização de células, a qual representa um evento básico do desenvolvimento em eucariotos, é definida como citodiferenciação. Em plantas superiores, um dos sistemas mais eficientes para se estudar a citodiferenciação, do ponto de vista citológico e genético, é a formação de células semelhantes aos elementos do traqueais a partir de células parenquimáticas (FUKUDA & KOMAMINE, 1985).

Os elementos traqueais, termo geral usado para designar células condutoras constituintes do xilema, apresentam as seguintes vantagens para os estudos de citodiferenciação: fácil identificação e quantificação, pois o espessamento da parede secundária em padrões determinados, anular, espiral, reticulado ou pontuado é facilmente identificável a nível de microscopia fotônica; os compostos químicos requeridos para a indução dos mesmos são relativamente simples e, apresentam uma sequência bastante clara de alterações durante sua diferenciação (DODDS & ROBERTS, 1985).

Inúmeros fatores, tais como fitorreguladores, nutrientes, luz, estágio de desenvolvimento do explante e idade da cultura, podem influir no grau de ocorrência e diferenciação dos elementos traqueais (BHOJWANI & RAZDAN, 1983; DIXON, 1985).

A grande discussão que permanece a respeito da citodiferenciação de elementos traqueais é se a divisão celular é um pré-requisito ou não para a sua ocorrência.

Muitos estudos abordando esta questão comprovaram a necessidade de divisão celular para que elementos traqueais fossem diferenciados (BORNMAN *et alii*, 1977; Torrey & Fosket, citados por BHOJWANI & RAZDAN, 1983;Dodds, citado por DODDS & ROBERTS, 1985).

No entanto, dados mais recentes envolvendo diferentes sistemas mostram claramente que, nem sempre a divisão celular é um pré-requisito para a diferenciação de elementos traqueais (FUKUDA & KOMAMINE, 1985).

Os sistemas em estudo têm demonstrado que células parenquimáticas quiescentes quando estimuladas, podem sofrer uma reprogramação que as levem a transdiferenciar-se, isto é, a diferenciar-se diretamente em um novo tipo celular, no caso, em elementos traqueais. Ferimentos mecânicos, reguladores de crescimento como auxina, citocinina e etileno, cálcio, seriam alguns dos fatores a servir de estímulo para que estas células parenquimáticas sofressem transdiferenciação (SUGIYAMA & KOMAMINE, 1990).

A nível de síntese de DNA, FUKUDA & KOMAMINE (1985) estabelecem a hipótese de que uma pequena quantidade de DNA independentemente da replicação do genoma na fase S do ciclo celular, deva ser imprescindível à transdiferenciação.

É fato bem conhecido que a constituição estrutural e os diferentes graus de diferenciação celular de um calo irão determinar sua morfologia externa. Assim, as variações observadas quanto a textura, peso etc., refletem um maior ou menor número de centros meristemáticos organizados, nódulos, células diferenciadas, bem como o arranjo ou acondicionamento destas células no calo (KRAUS *et alii*, 1985; WILLIAMS *et alii*, 1990).

Na análise do padrão estrutural do calo, torna-se fundamental o conhecimento da estrutura anatômica do explante.

O único relato da anatomia foliar de *S. guianensis* var. *canescens*, cujas folhas são do tipo composto-

-trifoliada, foi realizado por D'ASSUMPÇÃO (1978), o qual fornece a seguinte caracterização deste órgão:

a) epiderme adaxial: "células epidérmicas de paredes lisas; estômatos encontrados isoladamente; pêlos simples enormes";

b) epiderme adaxial: "células epidérmicas de paredes lisas; estômatos encontrados em grupos de 3 a 5; pêlos simples em maior quantidade";

c) lâmina foliar: "parênquima paliçádico formado por uma camada de células muito alongadas; parênquima lacunoso formado por 2 a 3 camadas de células; hipoderme bem desenvolvida; epiderme abaxial papilosa";

d) nervura média: "epiderme unisseriada, com tricomas; hipoderme; ausência de um parênquima definido; uma grande faixa esclerenquimatosa envolvendo o tecido vascular; parênquima medular com alguma clorofila".

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Botânico

Utilizou-se no presente trabalho, o *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. var. *canescens* Ferr. e Costa, cultivar IRI 1022, cujas sementes foram cedidas pelo Dr. Nuno Maria Sousa Costa, da EPAMIG e pelo Instituto de Pesquisas IRI.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção de explantes

As sementes, foram inicialmente escarificadas, através da imersão em H_2SO_4 concentrado por 5 minutos, sob agitação; em seguida, enxaguadas em água corrente e secas em papel toalha.

Após a escarificação, as sementes foram esterilizadas em câmara de fluxo laminar.

O processo de esterilização consistiu em submeter as sementes a etanol 70% por 40 segundos e em seguida a NaOCl 2% por 10 minutos e, então, enxaguá-las três vezes em água destilada esterilizada.

Após a retirada do excesso de água com papel filtro ou toalha, esterilizados, as sementes em grupos de 5 a 8 foram colocadas em frascos medindo 5,0x10,0 cm (Figura 1A) os quais, continham individualmente 20 ml de meio para germinação.

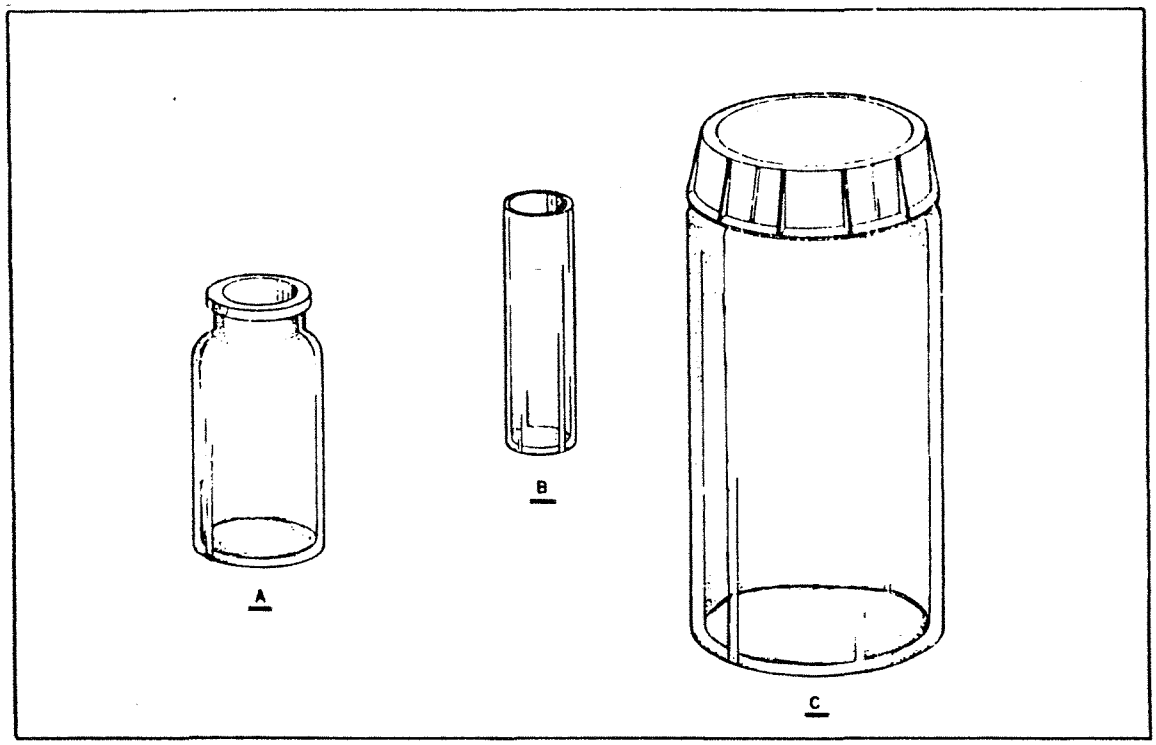


Figura 1. Frascos de cultura utilizados nas diferentes etapas do processo de regeneração de plantas *in vitro*.

O meio para germinação foi preparado a partir de uma solução nutritiva contendo sais de meio basal MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com concentrações reduzidas à metade e 1,5% (p/v) de sacarose. Uma vez ajustado o pH desta solução para 5,8 ± 0,1 adicionou-se à mesma 0,7% (p/v) de ágar SEALGAS®. O meio foi então distribuído nos frascos de cultura e autoclavado a 120°C e 1,0 atm por 20 minutos.

Os frascos inoculados com sementes foram vedados com filme transparente de PVC ROLOPAC® e mantidos em condições de temperatura entre 25 a 28°C, fotoperíodo de 16 horas luz, intensidade luminosa média de 1384 lux, ou aproximadamente 24,54 $\mu Em^{-2}sec^{-1}$ (CROOKSTON *et alii*, 1975) provenientes de lâmpadas fluorescentes Branca Fria (Sylvania, 85 W).

Decorridos 30 a 35 dias da data da semeadura *in vitro*, as plântulas oriundas da germinação foram utilizadas como fonte doadora de explantes.

Com o auxílio de um bisturi, as regiões centrais dos folíolos da segunda e terceira folhas sofreram dois cortes perpendiculares ao seu maior eixo (Figura 2) dando origem a explantes de aproximadamente 16,0 mm^2.

Cada plântula forneceu de 6 a 12 explantes foliares, de acordo com o experimento.

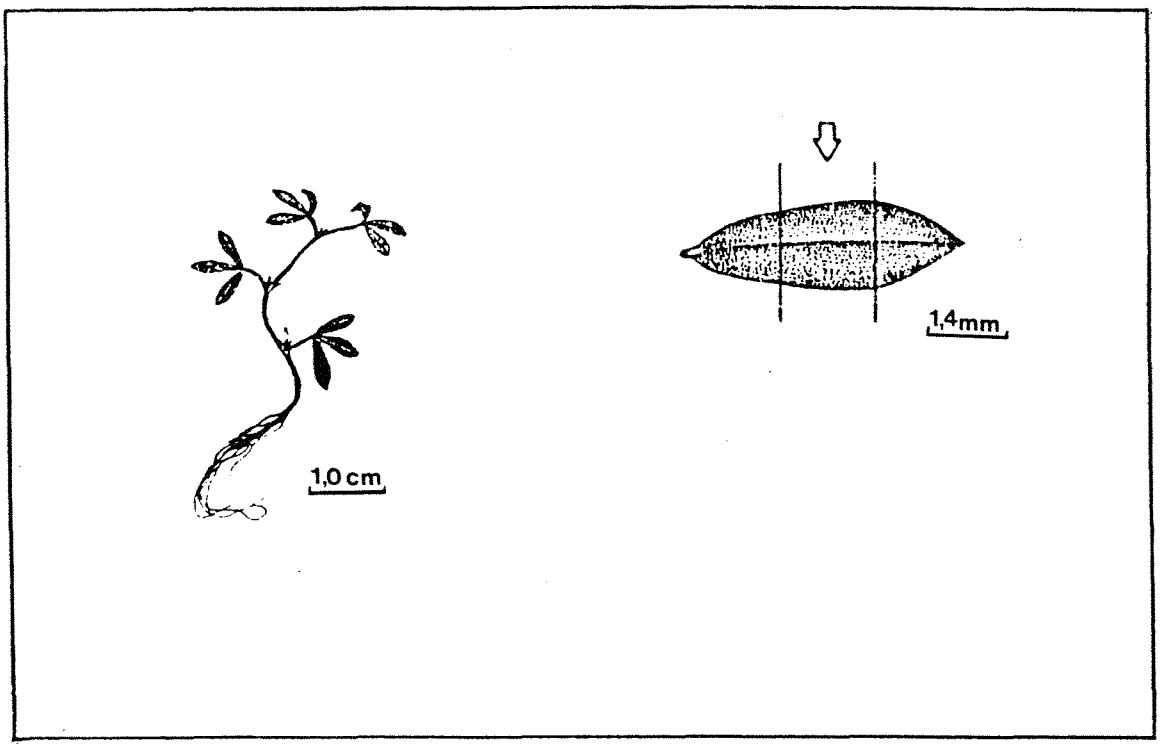


Figura 2. Aspecto geral da planta de *Stylosanthes guianensis* cv IRI 1022 germinada *in vitro* e detalhe do folíolo usado na obtenção de explante (seta) para a indução de calo.

3.2.2. Estabelecimento de culturas de calo, regeneração e aclimatação de plantas

Conforme apresentado na Revisão, os dados da literatura mostram como um todo a eficiência do meio MS suplementado com auxinas e/ou citocininas sintéticas, em promover a indução e manutenção de culturas de calos, bem como, a regeneração de brotos no gênero *Stylosanthes* e em particular, na espécie *S. guianensis*.

Com base nos dados da literatura, em informações relatadas por Ferreira[1] e de acordo com os objetivos propostos por este estudo, inicialmente foram conduzidos experimentos visando conhecer o comportamento morfogenético do material em estudo sob diferentes concentrações de fitorreguladores.

3.2.2.1. Estabelecimento de culturas de calo

O meio basal utilizado nesta etapa experimental e nas seguintes foi o MS, como descrito originalmente por MURASHIGE & SKOOG (1962):

a) Macronutrientes	(mg/l)
NH_4NO_3	1650,0
KNO_3	1900,0
$CaCl_2.2H_2O$	440,0
$MgSO_4.7H_2O$	370,0
KH_2PO_4	170,0
Na_2 EDTA	37,25
$FeSO_4.7H_2O$	27,85

---

[1] **FERREIRA, M.E.** (Bioplanta Tecnologia de Plantas Ltda., Paulínia). Anotações, 1987.

b) Micronutrientes	(mg/l)
$MnSO_4.4H_2O$	22,30
$ZnSO_4.4H_2O$	8,60
H_3BO_3	6,20
KI	0,83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25
$CuSO_4.5H_2O$	0,025
$CoCl_2.6H_2O$	0,025

c) Vitaminas	(mg/l)
glicina	2,0
ácido nicotínico	0,5
piridoxina	0,5
tiamina	0,1

Sacarose	30 g/l

O meio basal foi suplementado com os reguladores de crescimento NAA e BAP nas seguintes concentrações:

BAP (mg/l) \ NAA (mg/l)	0,0	0,1	0,4	1,0	2,0
0,0					
0,1					
0,4					
1,0					
2,0					

Após suplementação da solução nutriente com reguladores de crescimento, ajustou-se o pH para 5,8 ± 0,1 e acrescentou-se 0,7% (p/v) de ágar SEALGAS®. O tipo de frasco, o volume de meio distribuído por frasco e as condições de autoclavagem dos meios foram as mesmas descritas no item

3.2.1..

A inoculação dos explantes ocorreu dentro de um delineamento estatístico inteiramente casualizado. Foram colocados 6 explantes por frasco - correspondendo a parcela experimental - 5 frascos (repetições) por meio, totalizando 30 explantes por tratamento. Cada plântula oriunda de semente e posteriormente usada como explante, foi considerada um genótipo.

As culturas de calo a partir de explantes foliares, foram induzidas e mantidas em condições de temperatura entre 25 a 28°C, fotoperíodo de 16 horas luz, intensidade de radiação luminosa média de 1600 lux ou aproximadamente 28,36 $\mu E\ m^{-2}\ sec^{-1}$ proveniente de lâmpadas fluorescentes Branca Fria (Sylvania, 85 W).

A indução e subsequente crescimento de calos, foram avaliados 30 dias após a inoculação dos explantes. Esta avaliação consistiu em:

a) pesagem de calo (peso fresco em grama);

b) contagem aproximada do número de gemas e/ou brotos regenerados (nº G/B) com respectiva atribuição de notas;

Número de gemas e/ou brotos/calo	Nota
0	0
1 - 5	1
6 - 10	2
11 - 15	3
16 - 20	4
+ 20	5

c) atribuição de nota à cor do calo:

c.1) Cultivo na luz

Cor	Nota
verde esbranquiçado	1
verde claro	2
verde médio	3
verde amarelado	4
verde amarronzado	5
marrom	6

c.2) Cultivo no escuro

Cor	Nota
branco	1
creme	2

d) atribuição de nota à textura do calo:

Textura	Nota
friável	1
intermediária	2
compacta	3

Nestas avaliações, rizogênese, foi considerada um aspecto negativo; explantes que apresentaram este tipo de resposta exclusivamente foram avaliados quanto a intensidade (+) de raízes formadas e, as concentrações de fitorreguladores que as promoveu, foram descartadas para avaliações posteriores.

Este procedimento baseou-se no fato de que, a indução de brotos em calos com raiz mostra-se difícil, sendo mais prático portanto, a indução de raízes em partes aéreas

regeneradas, do que o contrário (MURASHIGE, 1974).

Ao final desta primeira etapa foram selecionados 5 meios, os quais, se mostraram satisfatórios à indução e crescimento de calos:

- Meio 1: MS + 1,0 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP
- Meio 2: MS + 1,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP
- Meio 3: MS + 2,0 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP
- Meio 4: MS + 2,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP
- Meio 5: MS + 1,0 mg/l NAA + 2,0 mg/l BAP

A partir desta seleção dois encaminhamentos foram adotados, dando prosseguimento ao estudo:

I - Condução daqueles calos induzidos em meios selecionados na etapa precedente visando a regeneração, alongamento e enraizamento de partes aéreas *in vitro*, bem como a aclimatação de plantas inteiras regeneradas.

II - Estabelecimento de novas culturas de calos em meios selecionados a partir deste trabalho e/ou de dados da literatura, visando uma análise mais abrangente do processo de indução de calos em explantes foliares.

3.2.2.2. Regeneração e aclimatação de plantas

Em relação ao encaminhamento I, procedeu-se do seguinte modo:

Segmentos de calos induzidos nos 5 meios selecionados na fase inicial do trabalho, foram transferidos para

meios controle e meios de regeneração de brotos.

Os meios controles consistiram em meios frescos, cujos sais, fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento foram mantidos em condições idênticas àquelas presentes nos 5 meios selecionados.

Nos meios de regeneração avaliados, foram mantidos os nutrientes basais do meio MS acrescentando-se as seguintes concentrações do fitorregulador BAP:

MR_1: MS + 1,0 mg/l BAP

MR_2: MS + 2,0 mg/l BAP

Assim, partes de calos foram transferidas para meios controle de acordo com o meio de indução original e, para cada um dos dois meios de regeneração.

Os calos em meio controle sofreram repiques a intervalos médios de 30 a 45 dias e, pôde-se mantê-los, por até 12 meses ou mais.

Os calos em meio para regeneração sofreram repiques a cada 30 dias, durante um período de 60 dias. A partir daí, aqueles que mostraram regeneração foram manipulados no sentido de se obter plantas inteiras, o que também se deu em até 12 meses ou mais.

Cada broto regenerado e em início de alongamento, isto é, com cerca de 2,0 cm em média, foi isolado do restante do calo e transferido para novo frasco medindo 2,5 x 8,5 cm (Figura 1B), contendo 10 ml de meio MS com as concentrações de macro e micronutrientes, vitaminas e sacarose, reduzidas.

As primeiras transferências realizaram-se em meio MS reduzido à metade e posteriormente a um quarto.

O regulador de crescimento também teve suas concentrações progressivamente diminuídas.

Alongamentos desejáveis da parte aérea regenerada, foram obtidos através da manipulação destas concentrações.

A redução nas concentrações dos componentes do meio nutriente e a retirada do regulador de crescimento favoreceram também, o enraizamento dos brotos alongados. No entanto, o enraizamento sem indutores sintéticos mostrou-se lento e heterogêneo na população de brotos alongados. Para incrementar o enraizamento suplementou-se o meio nutriente com 0,2 mg/l de IBA.

O passo seguinte ao enraizamento, foi a aclimatação das plantas regeneradas.

Dois procedimentos foram efetuados na etapa de aclimatação.

O primeiro procedimento utilizado consistiu na transferência de plantas alongadas, com cerca de 6,0 cm de comprimento em média, enraizadas ou com gemas radiculares, do frasco de cultura para frascos maiores medindo 6,5 x 13,0 cm (Figura 1C), os quais, continham uma mistura de vermiculita e areia (1:1) autoclavada e regada com solução de sais do meio MS reduzida a um terço, livre de fitorreguladores. Estes frascos foram vedados com filme transparente de PVC/ROLOPAC®, e, mantidos por cerca de 30 dias nas mesmas

condições de temperatura e luminosidade, nas quais, as plantas foram obtidas.

Ao longo deste período o filme transparente sofreu perfurações, até ser retirado por completo.

A avaliação visual do vigor das plantas determinou o período de transplantio das mesmas para copos plásticos contendo uma mistura autoclavada de terra, vermiculita e areia (1:1:2), e regada com adubo químico comercial (Ouro Verde). A partir daí, as plantas foram mantidas em telado.

Posteriormente, novo procedimento passou a ser adotado. Neste, as plantas foram transferidas diretamente dos frascos de cultura para copos plásticos contendo uma mistura autoclavada de terra rica em adubo orgânico, vermiculita e areia (1:1:2), e regada com água destilada.

Estas plantas, já em copos, foram colocadas no interior de sacos plásticos ZAP®, com atmosfera saturada em água até, no mínimo, uma semana após o transplantio. O material foi mantido em telado.

Em ambos os procedimentos adotados, após o pegamento e crescimento, em torno de 15 cm em média, as plantas foram transferidas dos copos para sacos de muda onde permaneceram até o florescimento. Foi utilizada a nomenclatura proposta por LARKIN et alii (1984) para denominar os regenerantes primários e suas progênies (SC_1 e SC_2, respectivamente).

O número de plantas regeneradas, transplantadas e sobreviventes foi computado e organizado em forma de tabelas.

3.2.2.3. Efeito dos fatores fitorregulador e genótipo sobre o crescimento e o potencial morfogenético de calos

Quanto ao encaminhamento II, foram realizados cinco experimentos visando comparar o efeito de diferentes combinações de fitorreguladores selecionadas a partir da etapa 3.2.2.1 e/ou de dados da literatura, assim como, o efeito de genótipos sobre o crescimento e potencial morfogenético de calos durante a fase inicial da cultura.

Do mesmo modo que no item 3.2.2.1., cada conjunto de explantes oriundos de uma única plântula germinada *in vitro* foi considerado um genótipo.

Experimento 1: Efeito da fonte auxínica em conjunto com BAP e dos genótipos

As auxinas avaliadas foram 2,4-D e NAA:

Meio 1: MS + 2,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BAP (meio descrito por GODWIN *et alii*, 1987a, como o melhor para a manutenção de calo indiferenciado por longo tempo).

Meio 2: MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP (meio estabelecido para efeito de comparação entre as duas fontes auxínicas). O experimento foi montado dentro de um delinea-

mento estatístico fatorial.

Em cada meio, inoculou-se 5 genótipos por frasco, sendo a parcela experimental representada por 10 frascos totalizando 50 genótipos por meio e três repetições para cada frasco e portanto para cada genótipo.

As culturas foram mantidas nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa que as descritas no item 3.2.2.1..

Trinta dias após a inoculação dos explantes, os calos induzidos foram avaliados segundo os parâmetros, peso, número de gemas e/ou brotos, cor e textura, também como descrito no item 3.2.2.1..

Experimento 2: Efeito dos fitorreguladores NAA e BAP em três combinações distintas e dos genótipos

Utilizou-se o meio MS suplementado com as seguintes concentrações de fitorreguladores:

Meio 1: MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP

Meio 2: MS + 1,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP

Meio 3: MS + 2,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP

O delineamento estatístico utilizado, o número de genótipos e repetições por meio, foram os mesmos mencionados para o experimento 1, assim como, as condições de manutenção e avaliação das culturas de calos.

Experimento 3: Efeito dos fitorreguladores NAA e BAP combinados em concentrações proporcionalmente aumentadas e diminuídas em relação a um meio controle e dos genótipos

O meio MS + 1,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP, foi considerado meio de indução controle nesta etapa experimental.

Os meios MS + 4,0 mg/l NAA + 2,0 mg/l BAP e MS + 0,5 mg/l NAA + 0,25 mg/l BAP, foram meios experimentais.

Mantendo um delineamento estatístico do tipo fatorial , inoculou-se 30 genótipos nos meios mencionados. Cada frasco de cultura conteve 6 genótipos, sendo a parcela representada por 5 frascos, com 2 repetições.

As condições de manutenção e avaliação das culturas de calos foram as mesmas mencionadas no experimento 1.

Experimento 4: Efeito dos fitorreguladores NAA e BAP sob duas condições de luminosidade e dos genótipos

As condições de luminosidade avaliadas foram:

a) Fotoperíodo 16 horas de luz (intensidade luminosa média de 1.600 lux, ou aproximadamente 28,36 $\mu Em^{-2}sec^{-1}$ proporcionada por lâmpada fluorescente Branca Fria (Sylvania, 85 W).

b) Escuro contínuo.

Os meios avaliados foram:

Meio A: MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP

Meio B: MS + 1,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP

O delineamento experimental foi o mesmo utilizado no experimento 3 e as condições de manutenção das culturas e de avaliação dos calos (exceto as referentes a luminosidade), foram as mesmas mencionadas no experimento 1.

Experimento 5: Efeito de três genótipos SC_2 e dos fitorreguladores NAA e BAP

- Os genótipos testados, foram designados por: G_{32}, G_{83} e G_{113}.

- Os meios avaliados foram:

Meio A: MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP

Meio B: MS + 1,0 mg/l + 0,4 mg/l BAP

Neste experimento, a parcela experimental em cada meio de cultura foi representada por um frasco inoculado com 2 explantes de cada genótipo, perfazendo um total de 6 explantes por frasco e um total de 15 frascos por meio.

As condições de manutenção e avaliação das culturas de calos foram as mesmas mencionadas no experimento 1.

3.2.3. Análise estatística dos dados

Quatro variáveis foram avaliadas nos diferentes experimentos; em apenas uma delas - peso fresco de calo - cujas medidas foram realizadas em grama, as observações

apresentaram distribuição normal. Nas demais variáveis, número de gemas e/ou brotos; cor e textura de calo, cujas medidas foram realizadas através de atribuição de notas, as observações não apresentaram distribuição normal e nem foi possível obter tal distribuição com o uso de transformações.

Em vista de tal fato, as observações de todas as variáveis foram analisadas através de testes não-paramétricos.

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória, não paramétrica, para se verificar a simetria e o tamanho da cauda da distribuição dos dados.

A partir dos resultados desta análise, selecionou-se a função escore que levaria ao teste localmente mais poderoso. Uma das seguintes funções pôde ser selecionada em cada situação:

1) escore de Van der Varden (distribuição normal dos dados);

2) escore de Gastwirth (distribuição uniforme de dados);

3) escore de Wilcoxon (distribuição logística dos dados);

4) escore da mediana;

5) assimetria a direita;

4) assimetria a esquerda.

A seleção destas funções segue regras sugeridas por NEGRILLO (1989). Tais regras visam permitir a

obtenção de estimadores mais eficientes e testes localmente mais poderosos.

Uma vez selecionada a função escore, aplicou-se o teste estatístico para comparar os efeitos dos tratamentos.

A estatística do teste (Q) sob Ho, tem distribuição assintótica qui-quadrado com v graus de liberdade (χ^2_v), onde:

$$Q = \frac{SQ}{S^2}$$

SQ = soma de quadrados;

S^2 = variância.

Quando os valores calculados de Q foram maiores que os valores críticos de $\chi^2_{v(\alpha)}$, onde α igual a 10%, 5% ou 1%, a hipótese de nulidade foi rejeitada, isto é, houve evidências significativas de que pelo menos dois tratamentos diferiram entre si.

Nestas situações, para se detectar quais tratamentos mostraram diferenças significativas, foram realizadas comparações múltiplas entre tratamentos dois a dois.

Em delineamentos fatoriais, verificou-se também a existência ou não de interação entre fatores. Os fatores considerados foram, meio de cultura (fator A) e genótipo (fator B).

3.2.4. Histologia dos calos cultivados *in vitro*

Esta etapa experimental foi realizada com o objetivo de se estudar o processo de indução e diferenciação de calos a nível estrutural.

Folíolos de plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* e em vaso mantido sob telado, constituíram o material controle, o qual, sofreu três processamentos distintos:

1 - Cortes a mão livre: folíolos fixados em etanol 70% foram cortados a mão livre e tratados com cloreto de zinco iodado (SASS, 1951). Os cortes transversais obtidos foram montados em gelatina glicerinada (SASS, 1951).

2 - Cortes em micrótomo: folíolos fixados em etanol 70% ou FAA segundo SASS (1951) foram desidratados em série etílica, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo American Optical®, empregando metodologia clássica descrita por JOHANSEN (1940). Os cortes transversais e longitudinais de 15 μm de espessura, foram corados com safranina e verde firme, de acordo com a metodologia descrita por Foster e modificada por GIFFORD (1966). As lâminas histológicas foram montadas com bálsamo do canadá.

3 - Maceração: folíolos fixados em etanol 70% foram macerados de acordo com o método de Jeffrey descrito por JOHANSEN (1940). Após maceração, o material foi corado com hematoxilina de Delafield (JOHANSEN, 1940) e montado em

gelatina glicerinada (SASS, 1951).

O material experimental foi representado por explantes foliares inoculados com a porção abaxial em contato com o meio MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg /l BAP.

Foram coletadas diariamente três amostras do material inoculado, durante o período de trinta 30 dias.

As diversas amostras do material experimental seguiram os processamentos 2 e 3, descritos para o material controle.

Os estudos estruturais e ontogenéticos de calos *in vitro* foram realizados basicamente com as amostras de material experimental obtido, e contando com 1 a 10; 15; 20; 25 e 30 dias de cultivo. Quando necessário, idades intermediárias a estas também foram avaliadas.

Os aspectos estruturais mais relevantes das preparações histológicas e maceradas foram fotomicrografadas. Estas fotomicrografias foram realizadas em fotomicroscópios Olympus Vanox AHB-LB-1 com câmera PM 10 AC 35 AD-1 e Zeiss Jenamed, com câmera BCA-M eletronic e luz convencional e polarizada, utilizando-se filme Kodak Panatomic X-32 ASA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do Efeito de Fitorreguladores no Estabelecimento de Culturas de Calo

Na etapa inicial desse estudo onde se pretendeu verificar o efeito de meio de cultura, mais especificamente dos fitorreguladores NAA e BAP sobre a indução e crescimento de calos, o efeito genótipo não foi considerado.

Cabe relembrar que para cada meio avaliado, utilizou-se explantes oriundos de 6 plântulas, portanto 6 genótipos diferentes, e que, entre meios, os genótipos utilizados também diferiam.

Dois foram os motivos que levaram a se desconsiderar o efeito genótipo entre e dentro meios de cultura, nessa fase experimental.

O primeiro foi de ordem prática, pois, cada plântula de acordo com os parâmetros de coleta do explante (idade da plântula, número de folíolos e tamanho do explante) forneceu no máximo 12 explantes, número este insuficiente para ser avaliado em todos os meios de cultura, os quais, totalizaram 25 incluindo o meio controle, isto é,

meio MS livre de reguladores de crescimento, bem como para as repetições de cada um destes meios.

O segundo motivo foi o de adequação aos objetivos propostos neste estudo, ou seja, selecionar entre os meios testados aqueles que promovessem indução e crescimento satisfatórios de calos à uma média de genótipos da população avaliada.

Os resultados obtidos nos experimentos desta etapa inicial encontram-se nas Tabelas 2 a 8 e Figura 3.

Tabela 2. Respostas morfogenéticas em explantes foliares de *Stylosanthes guianensis* cv. IRI 1022 após 30 dias de cultura em meio MS (16 h luz/8 h escuro).

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)				
	0,0	0,1	0,4	1,0	2,0
0,0	-	R(+)	R(++)	R(++)	R(+++)
0,1	C	C	C	C	C
0,4	C	C	C	C	C
1,0	C	C	C	C	C
2,0	C	C	C	C	C

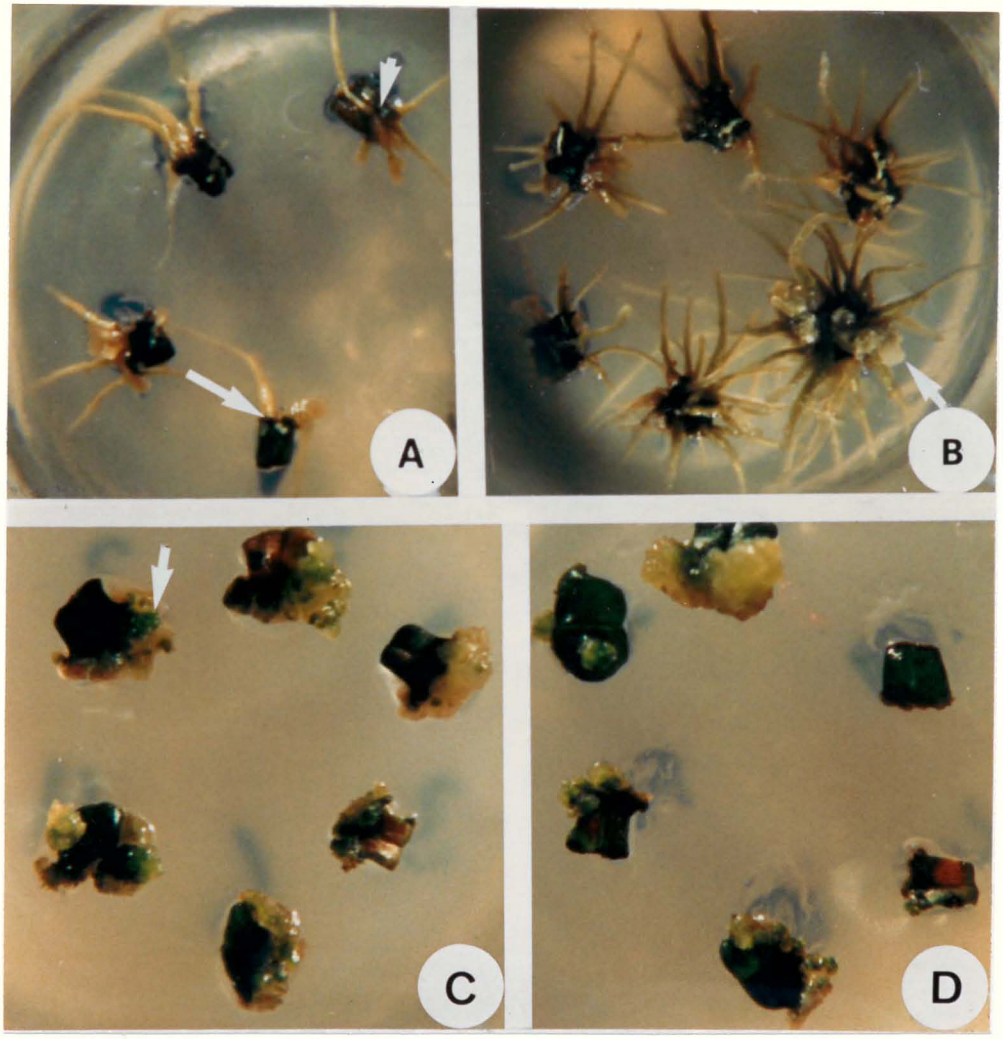
(-) : meio controle, morfogênese nula
(R) : meios indutores de rizogênese
(+) rizogênese baixa
(++) rizogênese moderada
(+++) rizogênese alta
(C) : meios indutores de calos

A Tabela 2 mostra de modo genérico as respostas dos explantes após 30 dias de cultura; basicamente três respostas estão discriminadas na mesma:

1. ausência de morfogênese (-);
2. indução de rizogênese direta e intensidade de raízes formadas (R/+);
3. indução e crescimento de calos (C).

A resposta nº 1 foi observada apenas no meio controle; os explantes inoculados neste meio, ao final de 30 dias de cultura, mostraram-se oxidados e sem indícios de morfogênese.

A resposta nº 2 foi observada nos meios suplementados apenas com o regulador de crescimento NAA; os explantes colocados nestes meios apresentaram como resposta, rizogênese direta (R), isto é, a formação de raízes sem a prévia indução de calos. A intensidade (+) de raízes formadas foi diretamente proporcional a concentração do fitorregulador NAA presente no meio de cultura, o que é mostrado também pela Figura 3(A e B). Em 3A, a concentração utilizada foi 0,4 mg/l de NAA e o número médio de raízes formadas por explante esteve entre 5 a 6; as setas indicam que as raízes originaram-se a partir das regiões de ferimento do explante e da nervura central. Em 3B, a concentração utilizada foi 2,0 mg/l de NAA e o número médio de raízes por explante esteve entre 12 a 15; a seta indica uma estrutura, semelhante a um calo, formada durante o desenvolvimento das raízes.



(A e B) rizogênese direta em meios MS suplementados com NAA isoladamente (0,4 e 2,0 mg/l, respectivamente). As setas em A indicam os locais de origem das raizes no explante e em B a indução de calo com o desenvolvimento das raizes; (C e D) indução de calos friáveis, de crescimento reduzido e com muitos pontos de regeneração em meios MS suplementados com BAP isoladamente (0,4 e 2,0 mg/l, respectivamente). A seta em C indica pontos de regeneração.

Figura 3. Respostas morfogenéticas obtidas após 30 dias de cultivo *in vitro* de explantes foliares de *S. guianensis* - cv IRI 1022.

O número médio de raízes por explante no meio MS+0,1 mg/l de NAA esteve em torno de 3 e, no meio MS+1,0 mg/l de NAA, entre 5 a 6, valores correspondentes, respectivamente, as intensidades baixa (+) e moderada (++) na Tabela 2.

Embora não se tenha realizado análises citohistológicas destas raízes, o aspecto geral por elas apresentado indicou um desenvolvimento provavelmente anormal.

A resposta nº 3 foi observada em todos os meios MS suplementados com NAA e BAP conjuntamente e naqueles suplementados apenas com BAP.

A Figura 3 (C e D) mostra calos induzidos em meios MS suplementados apenas com BAP (3C - meio MS + 0,4 mg/l de BAP; 3D - meio MS + 2,0 mg/l BAP). Os calos induzidos nestes meios apresentam textural friável, muitos pontos de regeneração e crescimento reduzido.

O crescimento e o potencial morfogenético dos calos induzidos nos meios promotores da resposta nº 3 foram avaliados 30 dias após o início das culturas com base nas variáveis peso fresco, número de gemas e/ou brotos (Nº G/B), cor e textura.

Os resultados destas avaliações se encontram nas Tabelas 3 a 8.

Verifica-se a partir da análise da Tabela 3 que os 20 meios de cultura capazes de promover a indução e crescimento de calos, promoveram também a organogênese de partes aéreas nestes calos. Estes meios podem ser distribuí-

dos em três grupos de acordo com as suas respostas específicas em relação a promoção de crescimento e freqüência de regeneração nos calos induzidos.

Tabela 3. Valores médios das variáveis peso fresco (g), número de gemas e/ou brotos (Nº G/B)*, cor* e textura* por calo e por meio de cultura após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Meios MS suplementados com NAA e BAP (mg/l)	VARIÁVEIS			
	PESO (g)	Nº G/B*	COR*	TEXTURA*
(1) 0,1BAP	0,025	0,70	3,67	1,97
(2) 0,4BAP	0,031	1,03	3,13	2,00
(3) 1,0BAP	0,031	1,13	3,20	1,73
(4) 2,0BAP	0,031	1,00	3,67	2,20
(5) 0,1NAA+0,1BAP	0,120	1,50	2,83	1,30
(6) 0,1NAA+0,4BAP	0,060	0,73	3,47	1,13
(7) 0,1NAA+1,0BAP	0,077	1,60	3,37	1,73
(8) 0,1NAA+2,0BAP	0,098	1,47	3,30	1,83
(9) 0,4NAA+0,1BAP	0,157	0,27	2,60	1,67
(10) 0,4NAA+0,4BAP	0,165	1,60	2,53	2,50
(11) 0,4NAA+1,0BAP	0,190	1,33	2,80	1,77
(12) 0,4NAA+2,0BAP	0,164	1,67	3,73	2,06
(13) 1,0NAA+0,1BAP	0,208	0,63	1,93	2,33
(14) 1,0NAA+0,4BAP	0,220	1,20	3,06	2,27
(15) 1,0NAA+1,0BAP	0,267	0,63	1,93	2,80
(16) 1,0NAA+2,0BAP	0,241	1,07	2,13	2,37
(17) 2,0NAA+0,1BAP	0,213	0,07	1,83	2,73
(18) 2,0NAA+0,4BAP	0,278	0,63	2,30	2,80
(19) 2,0NAA+1,0BAP	0,251	0,80	2,13	2,93
(20) 2,0NAA+2,0BAP	0,207	0,60	2,20	2,73

*Ver em "Material e Métodos", a escala de notas atribuidas às variáves.

Um primeiro grupo seria constituído por aqueles meios suplementados apenas por BAP (meios 1 a 4) e também por aqueles cujas concentrações de BAP são superiores ao dobro em relação às concentrações de NAA (meios 6 a 8 e 12). Os calos induzidos nestes meios tendem a apresentar crescimento reduzido, coloração verde médio ou verde amarelado (notas 3 e 4 respectivamente), textura intermediária (nota 2) tendendo a friável (nota 1) e as mais altas freqüências de regeneração, isto é, de 1 a 5 e de 6 a 10 gemas e/ou brotos por calo (notas 1 e 2 respectivamente para Nº G/B). Nestes grupos verifica-se ainda que aqueles meios suplementados com BAP e NAA conjuntamente (meios 6 a 8 e 12) promoveram, nas condições experimentais deste estudo, crescimentos de calos no mínimo duas vezes superior em relação aos suplementados apenas com BAP (meios 1 a 4).

Os dois outros grupos visualizados a partir da Tabela 3 estariam constituídos por meios suplementados por NAA e BAP conjuntamente.

Um segundo grupo, portanto, seria formado por aqueles meios suplementados com 1,0 mg/l ou 2,0 mg/l de NAA e BAP nas proporções de 1:1 (meios 15 e 20) e também, por todos aqueles suplementados com 2,0 mg/l de NAA independentemente das concentrações de BAP (meios 17 a 20). Os calos induzidos nestes meios tendem a apresentar os maiores crescimentos verificados neste estudo, coloração verde claro (nota 2), textura compacta (nota 3) e as mais baixas freqüências de regeneração, isto é, de 0 a menos que 5 gemas

e/ou brotos por calo (notas 0 a 1 para Nº G/B).

O terceiro, último grupo, seria constituído por aqueles meios suplementados com 0,1 mg/l ou 0,4 mg/l de NAA e BAP nas proporções de 1:1 (meios 5 e 10), meios suplementados com concentrações de NAA no máximo igual a 1,0mg/l e proporcionalmente superiores ao dobro das concentrações de BAP (meios 9 e 13), e, também, por aqueles meios suplementados com concentrações máximas de NAA igual a 1,0 mg/l e de BAP igual a 2,0 mg/l nas proporções de 2:1 ou próximas a este valor (meios 11, 14 e 16). Os calos induzidos nestes meios, de modo geral, apresentam valores de crescimento e potencial morfogenético intermediários aos verificados nos dois grupos precedentes; estes valores tendem a ser mais próximos àqueles verificados a um dos dois outros grupos em função das semelhanças nas concentrações e proporções de NAA e BAP entre eles.

Através de análises estatísticas das observações obtidas para as variáveis peso fresco, número de gemas e/ou brotos, cor e textura, pôde-se comprovar que as diferenças verificadas entre os 20 meios de cultura avaliados são significativas do ponto de vista estatístico.

O procedimento adotado na análise de cada variável consistiu em selecionar a função escore, aplicar o teste e confrontar o valor calculado da estatística Q com o valor tabelado para χ^2 com 19 graus de liberdade (α=10%, 5% ou 1%) e, sendo o valor calculado significativo, realizaram-se comparações múltiplas entre os meios de cultura 2 a 2

para se detectar quais diferiam entre si.

A função selecionada para as variáveis peso fresco, cor e textura foi a Escore de Gastwirth e os resultados das comparações múltiplas se encontram nas Tabelas 4, 6 e 7, respectivamente; para a variável número de gemas e/ou brotos a função selecionada foi a Assimetria a Direita e os resultados das comparações múltiplas se encontram na Tabela 5.

A Tabela 8 reúne as comparações múltiplas entre os meios de cultura com base nas quatro variáveis em estudo.

Verifica-se a partir da Tabela 4 que as diferenças estatísticas significativas para a variável peso fresco foram encontradas basicamente entre dois grupos de meios, os quais correspondem ao primeiro e segundo grupos discriminados com base nos resultados da Tabela 3. Um destes grupos, constituído pelos meios 1 a 4, representa os valores mínimos obtidos para esta variável nas condições experimentais deste estudo e são os meios suplementados apenas com BAP. Por outro lado, o grupo constituído pelos meios 15, 16, 18 e 19, representa os valores máximos.

Tabela 4. Comparações múltiplas para variável peso fresco de calos induzidos em meios MS suplementados com 20 combinações de NAA e BAP após 30 dias de cultura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	ns	**	**	ns
2			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	ns	**	**	ns
3				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	**	*	ns
4					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	**	*	ns
5						ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
6							ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7								ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
8									ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
9										ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
10											ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
11												ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
12													ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
13														ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
14															ns	ns	ns	ns	ns	ns
15																ns	ns	ns	ns	ns
16																	ns	ns	ns	ns
17																		ns	ns	ns
18																			ns	ns
19																				ns
20																				

ns = não significativo
\+ = significativo a 10%
* = significativo a 5%
** = significativo a 1%

Em relação à variável Nº G/B, observa-se através da Tabela 5 que as diferenças significativas ocorrem entre o meio 9 e os meios 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 14 e 16 e entre o meio 17 e os meios 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 14 e 16; os meios 9 e 17 não diferem entre si. Ao se confrontar os resultados das Tabelas 3 e 5, nota-se que os meios 9 e 17 apresentam as mais baixas freqüências de regeneração entre os 20 meios avaliados.

A Tabela 6 mostra que as diferenças significativas verificadas para a variável cor, foram detectadas entre meios que tendem a induzir calos com coloração verde amarelado (meios 1 e 4) e aqueles que tendem a induzir calos com coloração verde claro (meios 13, 15, 17 e 19).

Quanto à variável textura, verifica-se a partir da Tabela 7 que há diferenças significativas entre aqueles meios que tendem a induzir calos friáveis (meios 5 e 6) e os que tendem a induzir calos com textura intermediária (meio 10) ou compacta (meios 15, 17, 18, 19 e 20) assim como, entre aqueles que tendem a induzir calos com textura intermediária (meios 8 e 9) e compacta (meio 19).

Todas as diferenças estatísticas significativas encontradas em cada uma das variáveis estão reunidas na Tabela 8; estas diferenças de um modo geral, foram encontradas entre valores extremos de cada variável.

Tabela 5. Comparações múltiplas para variável número de gemas e/ou brotos (Nº G/B) em calos induzidos em meio MS suplementados com 20 combinações de NAA e BAP após 30 dias de cultura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2			ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
3				ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
4					ns	ns	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
5						ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
6							ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7								ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
8									*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
9										*	*	*	ns	*	ns	+	ns	ns	ns	ns
10											ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
11												ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
12													ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
13														ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
14															ns	ns	**	ns	ns	ns
15																ns	ns	ns	ns	ns
16																	**	ns	ns	ns
17																		ns	ns	ns
18																			ns	ns
19																				ns
20																				

ns = não significativo
\+ = significativo a 10%
* = significativo a 5%
** = significativo a 1%

Tabela 6. Comparações múltiplas para variável cor em calos induzidos em meios MS suplementados com 20 combinações de NAA e BAP após 30 dias de cultura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
2			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
4					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	ns	+	ns	**	ns	+	ns
5						ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
6							ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7								ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
8									ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
9										ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
10											ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
11												ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
12													ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
13														ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
14															ns	ns	ns	ns	ns	ns
15																ns	ns	ns	ns	ns
16																	ns	ns	ns	ns
17																		ns	ns	ns
18																			ns	ns
19																				ns
20																				

ns = não significativo
\+ = significativo a 10%
* = significativo a 5%
** = significativo a 1%

Tabela 7. Comparações múltiplas para variável textura em calos induzidos em meios MS suplementados com 20 combinações de NAA e BAP após 30 dias de cultura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	ns
4					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
5						ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	*	**	**	**
6							ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	**	ns	**	**	**	**
7								ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
8									ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	ns
9										ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
10											ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
11												ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
12													ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
13														ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
14															ns	ns	ns	ns	ns	ns
15																ns	ns	ns	ns	ns
16																	ns	ns	ns	ns
17																		ns	ns	ns
18																			ns	ns
19																				ns
20																				

ns = não significativo
\+ = significativo a 10%
* = significativo a 5%
** = significativo a 1%

Tabela 8. Comparações múltiplas para as variáveis peso fresco, número de gemas e/ou brotos, cor e textura, em calos induzidos em meios MS suplementados com 20 combinações de NAA e BAP após 30 dias de cultura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	*	**	**	ns
2			ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	**	**	**	ns
3				ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	**	**	+	ns
4					ns	ns	ns	ns	+	ns	ns	ns	+	ns	+	*	**	**	+	ns
5						ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	*	**	**	**
6							ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	**	ns	**	**	**	**
7								ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
8									*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	+	ns
9										*	*	*	ns	*	ns	+	ns	ns	*	ns
10											ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
11												ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
12													ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
13														ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
14															ns	ns	**	ns	ns	ns
15																ns	ns	ns	ns	ns
16																	**	ns	ns	ns
17																		ns	ns	ns
18																			ns	ns
19																				ns
20																				

ns = não significativo
\+ = significativo a 10%
* = significativo a 5%
** = significativo a 1%

A precisão em se localizar diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos avaliados depende do número de repetições utilizadas e este número, de acordo com a teoria da análise estatística aplicada, deve ser no mínimo igual a 8 (NEGRILLO, comunicação pessoal).

Levando-se em conta os aspectos inerentes à cultura de tecidos, para se garantir as 8 repetições do material em cultura no momento da avaliação será necessário em muitos casos partir de um número de explantes superior a 8; este procedimento esbarra-se, no entanto, na impossibilidade que muitas vezes surge em se dispor de determinados explantes em quantidade desejável. De qualquer modo, o número adequado de repetições é um requisito que sempre deverá ser levado em conta quando se deseja conduzir um experimento em cultura de tecidos.

No presente estudo, para estes experimentos foram utilizadas 5 repetições por meio de cultura; possivelmente um número maior de diferenças estatísticas significativas entre os meios testados poderiam ser detectadas cumprindo-se o requisito acima mencionado.

Os resultados obtidos com a análise não-paramétrica, no entanto, são altamente coerentes com aqueles verificados a partir da Tabela 3, ou seja, diferenças significativas só ocorrem entre meios de cultura cujas concentrações de NAA e BAP são muito contrastantes o que implica em respostas ou efeitos também contrastantes. Como a faixa de variação entre as concentrações de fitorreguladores utiliza-

das neste estudo foi restrita, a maioria deste grupo de 20 meios tenderam a apresentar respostas semelhantes entre si; e no geral, todos os 25 meios induziram respostas típicas ao comportamento padrão *in vitro* da espécie *Stylosanthes guianensis*.

A espécie *S. guianensis*, *in vitro*, assim como o demonstrado por Skoog & Miller (citados por THORPE & MURASHIGE, 1970) em plantas de tabaco, sob a ação de estímulos exógenos de auxinas e citocininas é capaz de formar calos, raízes e/ou partes aéreas, comportando-se como um sistema modelo para estudos em cultura de tecidos.

Como regra geral, uma planta pode ser considerada um sistema experimental modelo em cultura de tecidos quando a presença de uma fonte de auxina isoladamente, induz rizôgenese prematura (o nível de auxina é determinado para cada espécie); a combinação auxina-citocinina induz regeneração de partes aéreas na presença de uma fase de calo e a presença de uma fonte de citocinina isolada promove organogênese direta ou a partir de uma fase muito branda de calo friável.

A organogênese de partes aéreas em explantes foliares de *S. guianensis* é facilmente obtida sob estímulo da citocinina sintética BAP (MEIJER & BROUGHTON, 1981; MROGINSKI & KARTHA, 1981; GODWIN *et alii*, 1987a).

No presente estudo onde se teve por objetivo a regeneração de plantas da cv IRI 1022 da espécie S. *guianensis* a partir de fases de calo mais longas, foi possível

determinar os níveis de BAP e NAA que promoveram as mais brandas e as mais longas fases de calo; fases mais brandas ou rápidas são indicadas para a clonagem ou propagação de materiais genéticos selecionados e as fases mais longas para a obtenção de variabilidade genética *in vitro*.

Valores altos para a relação NAA/BAP tendem a promover fases longas de calos, e baixos, fases brandas.

Assim, os resultados obtidos neste estudo com a cultivar IRI 1022, estão de acordo com os dados da literatura envolvendo outros materiais genéticos da espécie *S. guianensis*.

4.2. Análise dos Processos de Regeneração e Aclimatação de Plantas Inteiras (SC_1)

Os resultados obtidos da análise destes processos encontram-se nas Tabelas 9 e 10 e Figura 4.

A Figura 4 mostra o procedimento geral utilizado neste estudo para obtenção de plantas inteiras, regeneradas *in vitro* a partir de explantes foliares da cv IRI 1022.

Explantes colocados em meios de indução (ver item 4.1), iniciaram a formação de calos nas regiões do ferimento (Figura 4A) e ainda nestes meios, cresceram e começaram a diferenciar-se, apresentando pontos de regeneração (Figura 4B).

Após 30 dias, segmentos de calos induzidos, foram transferidos para meios de regeneração suplementados apenas com a citocinina BAP.

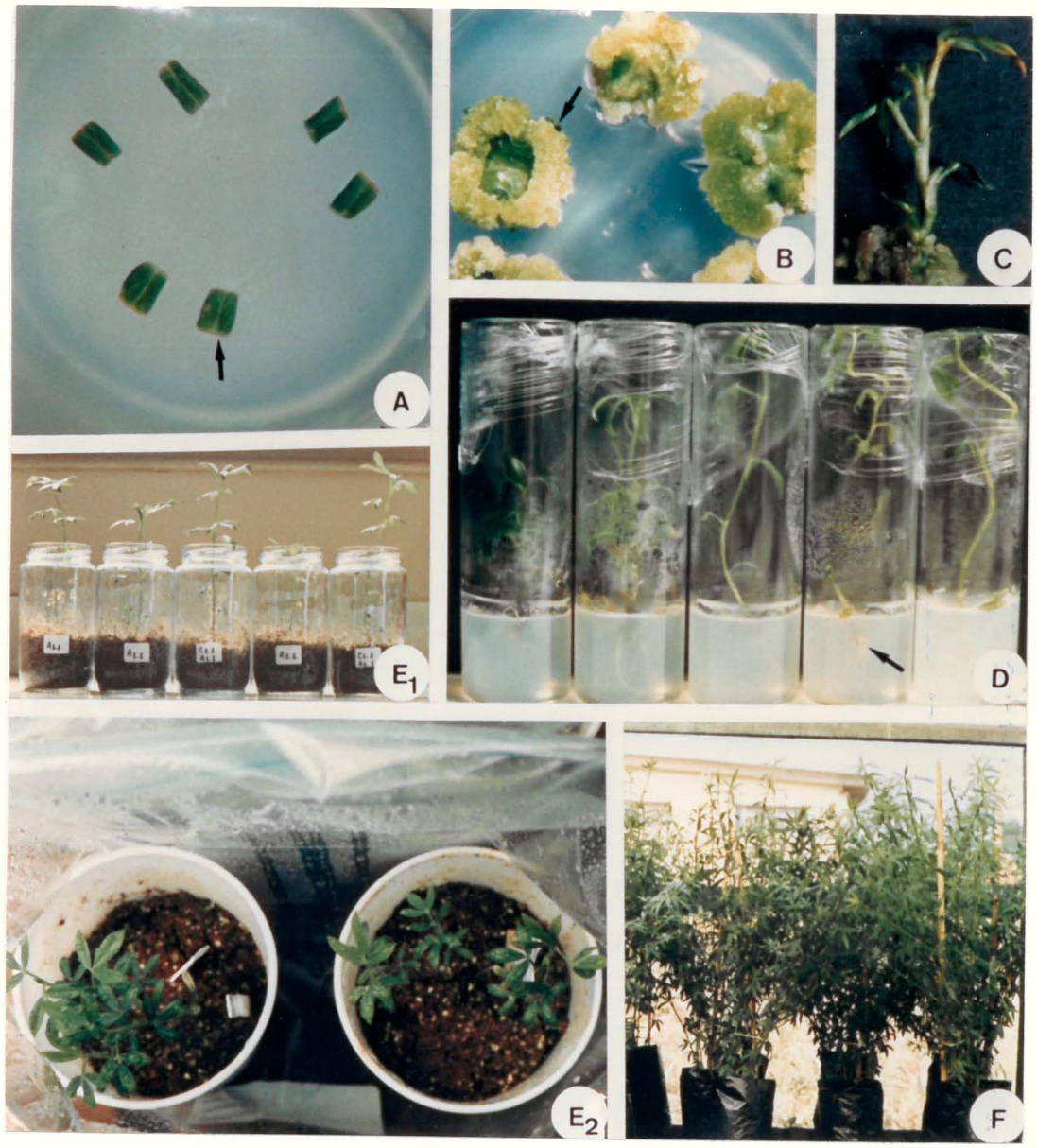
Nestes meios de regeneração, onde permaneceram por 60 dias, ocorreu a proliferação de brotos.

Brotos com alongamentos de 2,0 cm, em média, foram isolados do restante do calo (Figura 4C) e transferidos para frascos contendo meio basal MS e fitorregulador, reduzidos (Figura 4D). A Figura 4D mostra ainda, o enraizamento *in vitro* dos brotos alongados.

Alongamento e enraizamento, foram processos caracteristicamente lentos e heterogêneos. O enraizamento, especificamente, foi melhorado com a adição do fitorregulador IBA (0,2 mg/l) no meio de cultivo.

Os procedimentos utilizados para a aclimatação das plantas regeneradas estão representados na Figura 4E1 e 4E2. O cuidado com o fator umidade durante o período de transição do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* foi maior no procedimento representado na Figura 4E2, assim como o número de plantas sobreviventes obtidas.

Plantas regeneradas adultas, são mostradas na Figura 4F.



(A) indução de calos em explantes foliares cultivados em meio MS suplementado com NAA e BAP conjuntamente; a seta indica local de explante onde a indução tem inicio; (B) calos primários apresentando pontos de regeneração (seta) cerca de 3 semanas após inicio da cultura; (C) broto regenerado a partir de calo; (D) brotos alongados e enraizados (seta); (E1 e E2) aclimatação das plantas regeneradas em laboratório e em telado, respectivamente; (F) plantas regeneradas 6 meses após a saida do tubo de cultura para terra.

Figura 4. Procedimento geral usado para a obtenção de plantas inteiras regeneradas *in vitro* (SC_1) na cultivar IRI 1022.

A Tabela 9 apresenta o número de plantas transplantadas para a terra, as quais, foram obtidas a partir de dois meios de regeneração associados a cinco meios de indução de calos.

Verifica-se através desta tabela que o meio de regeneração MR_2 (MS+2,0 mg/l de BAP) no geral foi cerca de 20% mais efetivo em relação ao meio MR_1 (MS+1,0 mg/l) e que plantas foram regeneradas a partir de todos os meios de indução, selecionados a partir da etapa inicial deste estudo, porém, a porcentagem de plantas regeneradas foi maior nos meios de indução com 1,0 mg/l de NAA e 0,4 ou 2,0 mg/l de BAP.

O fato de o número de plantas regeneradas a partir do meio de indução MI_5 (MS+1,0 mg/l NAA+2,0 mg/l BAP) ter sido inferior ao observado para meios com a relação NAA/BAP alta, como por exemplo, o meio MI_3 (MS+2,0 mg/l NAA+0,1 mg/l BAP) foi decorrência de perdas de material inoculado ao longo dos subcultivos.

Entre os meios controles foi observado que aqueles suplementados com 2,0 mg/l de NAA e concentrações de BAP iguais a 0,1 ou 0,4 mg/l tenderam a manter-se indiferenciados ao longo do tempo de cultivo.

De modo geral a presença da auxina nos meios controle, inibiu a proliferação de brotos em calos aí inoculados.

A Tabela 10 representa o número de plantas transplantadas e sobreviventes, em função do período em que as transferências para ambientes *ex vitro* foram realizadas.

Tabela 9. Número de plantas obtidas a partir de calos mantidos por 30 dias em meios de indução (MI) e posteriormente transferidos para meios de regeneração (MR).

MS + fitorreguladores NAA + BAP (mg/l) MI	MS + fitorregulador BAP (mg/l) MR		
	1,0 BAP	2,0 BAP	Total
1,0 NAA 0,1 BAP	11	18	29
1,0 NAA 0,4 BAP	36	52	88
2,0 NAA 0,1 BAP	19	30	49
2,0 NAA 0,4 BAP	6	15	21
1,0 NAA 2,0 BAP	20	27	47
Total (%)	92 (39,3%)	142 (60,7%)	234

Tabela 10. Número de plantas SC_1 transplantadas e sobreviventes em função dos períodos de transplantios para ambientes *ex vitro*.

PERÍODO Semanas após data inicial da cultura	NÚMERO DE PLANTAS SC_1	
	TRANSPLANTADAS	SOBREVIVENTES
18	10	0
22	14	10
25	15	6
26	7	0
36	16	4
42	10	5
48	53	45
50	52	43
54	35	35
57	16	2
61	6	2
TOTAL	234	152

data inicial da cultura : 27/01/89.

Observa-se a partir desta tabela que os maiores índices de transplantios e sobrevivência foram obtidos nos períodos de 48, 50 e 54 semanas após a data inicial da colocação dos explantes em meio de cultura ocorrida em 27 de janeiro de 1989. Estes períodos coincidem com a realização de um segundo procedimento de aclimatação, no qual, as plantas SC_1 foram retiradas dos frascos de cultura e transferidas diretamente para copos plásticos contendo uma mistura de terra + vermiculita + areia e mantidas em telado sob alta umidade relativa, principalmente durante as primeiras semanas após a transferência do ambiente *in vitro* para *ex vitro*. Além da mudança no procedimento de aclimatação, as condições ambientais nos períodos de 48, 50 e 54 semanas, correspondentes respectivamente as datas de 5 e 10 de janeiro e 7 de fevereiro de 1990 foram extremamente favoráveis, com altas temperaturas diurnas, abundante luminosidade e temperaturas noturnas não inferiores a 25°C.

Verifica-se ainda através da Tabela 10 que os transplantios foram irregulares ao longo do tempo e extenderam-se por um período aproximado de 60 semanas.

Após 54 semanas a contar da data inicial da colocação dos explantes em meios de cultura, observa-se um declínio no número de plantas transplantadas, conseqüência do declínio no potencial organogenético dos calos.

A taxa de sobrevivência observada neste estudo em relação ao número total de plantas transplantadas foi de 65% (234 plantas transplantadas/152 plantas sobreviventes).

De acordo com MEIJER (1984), são esperadas taxas de sobrevivênca para a espécie *S. guianensis* na ordem de 50 a 70%.

Alguns aspectos morfológicos e fisiológicos das plantas SC_1 mantidas em telado até a maturidade, foram avaliados preliminarmente naquele grupo de plantas cujos transplantios para a terra ocorreram nos períodos de 48 e 50 semanas após o início da cultura. Este grupo além de ser o mais numeroso (88 plantas sobreviventes), constituiu-se de plantas com idades homogêneas e regeneradas a partir de calos mantidos por longos períodos em cultura, os quais, em função deste fator, entre outros, poderiam ter sofrido algum tipo de variação somaclonal.

Em relação a parte vegetativa, foi observado plantas SC_1 com número reduzido de ramos, sendo estes finos e alongados e com número de folhas também reduzido, em comparação com plantas oriundas de sementes e não submetidas ao cultivo *in vitro*; no total de 88 plantas, 23 apresentaram esta característica e entre estas, 82,6% pertenciam a um único genótipo denominado B5.1.

As plantas pertencentes ao genótipo B5.1 apresentaram ainda os menores índices de fertilidade, quer seja pelo não florescimento ou florescimento reduzido e baixa produção de sementes.

Outra característica associada a parte vegetativa de algumas plantas SC_1, distinta do observado para plantas oriundas de sementes e não submetidas ao cultivo *in vitro*, as quais apresentam ramos lisos, foi o aparecimento, nas primeiras, de cerdas ao longo dos ramos. Esta característica foi observada em plantas pertencentes a apenas um genótipo, genótipo B8.1.

Das 17 plantas, no total de 88, pertencentes ao genótipo B8.1, todas apresentaram cerdas ao longo dos ramos e as demais características vegetativas tais como número de ramos e de folhas por ramos, alongamento, etc, com aspecto normal. Estas plantas em conjunto foram ainda as mais prolíficas no grupo geral das 88 e, só perderam a nível individual para uma planta identificada como G113.

O florescimento entre as 88 plantas teve início em abril de 1990, portanto, 3 meses após a transferência das mesmas para a terra. No período de abril a agosto de 1990, acompanhou-se o desenvolvimento do florescimento e da produção de sementes nestas plantas e pode-se observar variações em quantidade e duração destes processos entre elas.

De um modo geral, esta avaliação preliminar indicou que existem variações em caracteres vegetativos e reprodutivos na população de plantas SC_1 regeneradas sob as condições experimentais desenvolvidas neste estudo. Se por um lado as variações demonstradas pelas plantas do genótipo B5.1 parecem deletérias e comum ao que vem sendo obtido por outros autores (GODWIN *et alii*, 1987a; MILES, *et alii*,

1989), aquelas variações apresentadas pelas plantas do genótipo B8.1, tendem a ser favoráveis. Além do não comprometimento da fertilidade, estas plantas apresentam cerdas em seus ramos, as quais, podem se constituir em mecanismos de defesa contra pragas como o observado em outras espécies do gênero *Stylosanthes* (SUTHERST *et alii*, 1988). No entanto, somente com avaliações realizadas no campo da citogenética, da genética quantitativa, molecular e bioquímica se poderá determinar com segurança o grau e a natureza das variações observadas nas pesquisas com cultura de tecidos, e consequentemente, o valor que elas possam ter do ponto de vista do melhoramento, entre outros.

4.3. Análise do Efeito dos Fatores Fitorregulador e Genótipo Sobre o Crescimento e o Potencial Morfogenético de Calos

Os resultados aqui contidos, referem-se aos experimentos conduzidos no encaminhamento II deste estudo.

Em todos estes experimentos, as observações obtidas para as variáveis peso, número de gemas e/ou brotos (Nº G/B), cor e textura de calos em relação aos fitorreguladores presentes nos meios de cultura onde foram induzidos (fator A), ou aos seus genótipos (fator B), sofreram análise estatística não paramétrica.

O procedimento adotado na análise de cada variável, em cada experimento, consistiu em selecionar a função escore, aplicar o teste e confrontar o valor calculado da estatística Q com o valor tabelado para χ^2 com os graus de liberdade respectivos (q = 5%) e, sendo o valor calculado significativo, realizaram-se comparações múltiplas entre os tratamentos 2 a 2 para se detectar quais diferiam entre si.

O conjunto de resultados obtidos nestes experimentos nos permitiram verificar não apenas o efeito dos fitorreguladores presentes nos meios de cultura sobre o crescimento e potencial morfogenético dos calos, como também o efeito de genótipos sobre estes parâmetros. O motivo que levou a se avaliar apenas "meios de indução de calos" nesta etapa específica do presente estudo, reside no fato de que nesta fase da cultura, têm início os primeiros eventos que levam à regeneração (MEIJER & BROUGTON, 1981; GODWIN *et alii*, 1987a).

4.3.1. Análise do efeito da fonte auxínica em conjunto com BAP e dos genótipos

Os resultados desta análise são relativos ao experimento 1, do item 3.2.2.3. de "Material e Métodos" e encontram-se nas Tabelas 11 e 12.

As funções selecionadas para as variáveis peso fresco, número de gemas e/ou brotos, cor e textura do fator A (meio de cultura) e do fator B (genótipo) foram, respecti-

vamente, Escore de Van der Warden, Assimetria a Direita, Assimetria a Direita e Assimetria a Esquerda.

Os resultados da aplicação do teste χ^2 com 1 grau de liberdade (α = 0,05) para o fator A, se encontram na Tabela 11.

Tabela 11. Estatísticas obtidas para o fator A (dois meios de cultura suplementados com fontes auxínicas distintas) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo.

VARIÁVEL	VALOR DA ESTATÍSTICA Q	MÉDIA	
		M_1	M_2
Peso (g)[a]	$0,48^{ns}$	0,366	0,373
Nº G/B[a]	$158,51^{*}$	0,45	1,83
Cor[a]	$97,33^{*}$	1,58	2,28
Textura[a]	$149,37^{*}$	2,63	1,82

(a) ver em "Material e Métodos" a escala de notas atribuidas às variáveis
M_1 = MS + 2,0 mg/l 2,4 D + 1,0 mg/l BAP
M_2 = MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP
ns = não significativo
* = Significativo a 5%
O valor tabelado para χ^2_1; 0,05 = 3.84.

O meio MS + 2,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BAP, foi descrito por GODWIN *et alii* (1987a) como o melhor meio entre aqueles avaliados em seu estudo, para manter calos originados a partir de explantes foliares de *S. guianensis* indiferenciados por longo tempo.

Verifica-se através da Tabela 11 que a substituição da auxina 2,4-D por NAA, mantendo-se no entanto as mesmas concentrações de auxina e citocinina BAP observadas no meio de cultura proposto por GODWIN *et alii* (1987a), promove diferenças estatísticas significativas quanto ao potencial morfogenético dos calos induzidos.

Enquanto no meio M_1 suplementado com 2,4-D, o valor para a variável número de gemas e/ou brotos tende a 0 (ausência de regeneração), no meio M_2 suplementado com NAA, este valor tende a 2 (6-10 gemas e/ou brotos por calo).

Em relação as variáveis cor e textura, verifica-se que o meio M_1 tende a promover valores médios iguais a 1 (verde esbranquiçado) e 3 (textura compacta) respectivamente. Os calos apresentando tais características em nossas avaliações, de modo geral, raramente sofreram regeneração.

Por outro lado, os valores médios para as variáveis cor e textura no meio M_2 tendem ambos a 2, verde claro e textura intermediária, respectivamente; estas características em nossos estudos indicam potencial regenerativo.

Os valores para a variável peso fresco, a qual reflete mais diretamente o crescimento dos calos, não diferiu estatísticamente nos dois meios avaliados.

Este conjunto de resultados demonstra que para a cultivar IRI 1022, assim como para outros materiais pertencentes a *S. guianensis*, os fitorreguladores NAA e BAP são altamente eficientes não apenas na indução e crescimento de calos, como também na diferenciação de gemas e/ou brotos.

No presente estudo, verificou-se ainda que as concentrações - 2,0 e 1,0 mg/l de NAA e BAP, respecitvamente - não foram as mais efetivas na manutenção de calos indiferenciados ao longo do tempo.

Os resultados da aplicação do teste χ^2 com 49 graus de liberdade (α = 0,05) para o fator B e para a Interação entre os fatores A e B, assim como, das comparações múltiplas para o fator B se encontram na Tabela 12.

Tabela 12. Estatística Q obtida para o fator B (50 genótipos) e para a interação AB (dois meios de cultura versus 50 genótipos) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo.

VARIÁVEL	VALOR DA ESTATÍSTICA Q (fator B)	COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS (fator B)[b]		VALOR DA ESTATÍSTICA Q (Interação entre fator A e B)
		Nº	%	
Peso (g)[a]	153,58*	71	5,8	118,85*
Nº G/B[a]	138,00*	57	4,65	146,40*
Cor[a]	132,66*	30	2,45	135,23*
Textura[a]	132,95*	64	5,22	130,16*

(a) ver em "Material e Métodos" a escala de notas atribuidas às variáveis
(b) número de contrastes que apresentam diferenças estatisticas significativas em um um total de 1225 contrastes.
* = Significativo a 5%.
O valor tabelado para χ^2_{49}; 0,05 = 67,50.

A Tabela 12 mostra que os 50 genótipos testados nos meios M_1 e M_2 apresentam diferenças estatísticas significativas entre si.

As diferenças observadas anteriormente entre os meios de cultura têm portanto, um componente genotípico; isto é demonstrado pela existência de interação significativa entre os fatores A (meio de cultura) e B (genótipo).

Assim, o crescimento de calos e a freqüência de regeneração nestes podem ser aumentados, selecionando-se conjuntamente meios de cultura e genótipos para tais parâmetros.

4.3.2. Análise do efeito dos fitorreguladores NAA e BAP em três combinações distintas e dos genótipos

Os resultados desta análise são relativos ao experimento 2 do item 3.2.2.3., de "Material e Métodos" e encontram-se nas Tabelas 13 e 14.

A função selecionada para as variáveis peso fresco, cor e textura dos fatores A e B foi a Escore de Wilcoxon e para a variável número de gemas e/ou brotos foi a Assimetria a Direita.

Os resultados da aplicação do teste χ^2 com 2 graus de liberdade (α = 0,05) e das comparações múltiplas realizadas para o fator A, encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13. Estatísticas obtidas para o fator A (três meios de cultura suplementados com concentrações distintas de NAA e BAP) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo.

VARIÁVEL	VALOR DA ESTATÍSTICA Q	COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS PARA OS NÍVEIS DO FATOR A			MÉDIAS		
		(M_1-M_2)	(M_1-M_3)	(M_2-M_3)	M_1	M_2	M_3
Peso (g)[a]	15,83*	*	*	*	0,356	0,317	0,345
Nº G/B[a]	9,18*	*	*	*	1,88	1,74	1,69
Cor[a]	92,79*	*	*	*	1,94	2,22	2,23
Textura[a]	47,20*	*	*	*	2,02	2,06	2,17

(a) ver em "Material e Métodos" a escala de notas atribuidas às variáveis
M_1 = MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP
M_2 = MS + 1,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP
M_3 = MS + 2,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP
* = Significativo a 5%.
O valor tabelado para χ^2_2; 0,05 = 5,99.

Os resultados da aplicação do teste χ^2 com 49 graus de liberdade (α = 0,05) e das comparações múltiplas realizadas para o fator B, assim como a aplicação do teste χ^2 com 98 graus de liberdade para a Interação entre os fatores A e B, encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14. Estatística Q obtida para o fator B (50 genótipos) e para a interação AB (três meios de cultura versus 50 genótipos) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo.

VARIÁVEL	VALOR DA ESTATÍSTICA Q (fator B)	COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS (fator B)[b]		VALOR DA ESTATÍSTICA Q (Interação entre fator A e B)
		Nº	%	
Peso (g)[a]	244,40*	262	21,38	142,02*
Nº G/B[a]	231,14*	295	24,08	162,70*
Cor[a]	252,56*	205	16,73	213,03*
Textura[a]	227,15*	273	22,28	160,49*

(a) ver em "Material e Métodos" a escala de notas atribuídas às variáveis
(b) número de contrastes que apresentam diferenças estatísticas significativas em um um total de 1225 contrastes.
* Significativo a 5%.
O valor tabelado para χ^2_{49}; 0,05 ≃ 67,50 e para χ^2_{98}; 0,05 ≅ 124,34.

Observa-se através da Tabela 13 que os valores médios para as variáveis peso fresco, número de gemas e/ou brotos, cor e textura nos três meios de cultura avaliados foram muito próximos; no entanto, todos diferiram estatisticamente ao nível de significância indicado.

Mesmo que os valores médios encontrados fossem idênticos entre si, tais diferenças estatísticas ainda poderiam, ocorrer. Isso se dá em função da análise estatística não paramétrica trabalhar com as posições ocupadas pelas observações e não com seus valores reais. Assim, quando dois tratamentos apresentarem valores médios idênticos para uma dada variável, mas o conjunto de observações que levaram a estes valores ocuparem postos diferentes, eles poderão dife-

rir estatísticamente entre si.

Na prática experimental, porém, as diferenças verificadas nas respostas promovidas entre os meios M_1 e M_2 foram sempre pequenas. A explicação para as diferenças estatísticas significativas observadas entre eles parece estar nos resultados apresenta- dos na Tabela 14. Provavelmente o grande número de diferenças estatísticas significativas encontradas entre os genótipos, esteja refletido nos dados obtidos para o fator A (meio de cultura).

A ocorrência de valores significativos da estatística Q para a Interação entre os fatores A e B dão embasamento para esta colocação.

4.3.3. Análise do efeito dos fitorreguladores NAA e BAP combinados em concentrações proporcionalmente aumentadas e diminuídas em relação a um meio controle e dos genótipos

Os resultados desta análise são relativos ao experimento 3 do item 3.2.2.3., de "Material e Métodos" e encontram-se nas Tabelas 15 e 16 e Figura 5.

A função selecionada para as variáveis peso fresco, número de gemas e/ou brotos, cor e textura dos fatores A e B foi a Assimetria a Direita.

Os resultados da aplicação do teste χ^2 com 2 graus de liberdade (α = 0,05) e das comparações múltiplas realizadas para o fator A, encontram-se na Tabela 15.

Os resultados da aplicação do teste χ^2 com 29 graus de liberdade (α = 0,05) e das comparações múltiplas realizadas para o fator B, assim como a aplicação do teste χ^2 com 58 graus de liberdade para a interação entre os fatores A e B, encontram-se na Tabela 16.

Tabela 15. Estatísticas obtidas para o fator A (três meios de cultura suplementados com NAA e BAP em concentrações proporcionalmente aumentadas e diminuídas em relação a um meio controle) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo.

VARIÁVEL	VALOR DA ESTATÍSTICA Q	COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS PARA OS NÍVEIS DO FATOR A			MÉDIA		
		(M_1-M_2)	(M_1-M_3)	(M_2-M_3)	M_1	M_2	M_3
Peso (g)[a]	31,91*	*	*	*	0,189	0,272	0,190
Nº G/B[a]	106,30*	*	*	*	1,76	0,63	1,66
Cor[a]	139,78*	*	*	*	2,08	1,13	2,21
Textura[a]	149,48*	*	*	*	1,76	2,65	1,55

(a) ver em "Material e Métodos" a escala de notas atribuidas às variáveis
M_1 = MS + 1,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP (meio controle)
M_2 = MS + 4,0 mg/l NAA + 2,0 mg/l BAP
M_3 = MS + 0,5 mg/l NAA + 0,25 mg/l BAP
* = Significativo a 5%
O valor tabelado para χ^2; 0,05 = 5,99.

Tabela 16. Estatística Q obtida para o fator B (30 genótipos) e para a interação AB (três meios de cultura versus 30 genótipos) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo.

VARIÁVEL	VALOR DA ESTATÍSTICA Q (fator B)	COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS (fator B)[b]		VALOR DA ESTATÍSTICA Q (Interação entre fator A e B)
		Nº	%	
Peso (g)[a]	124,29*	89	20,45	79,92ns
Nº G/B[a]	109,81*	83	19,08	90,19*
Cor[a]	114,17*	88	20,22	86,72*
Textura[a]	97,56*	64	14,71	16,02ns

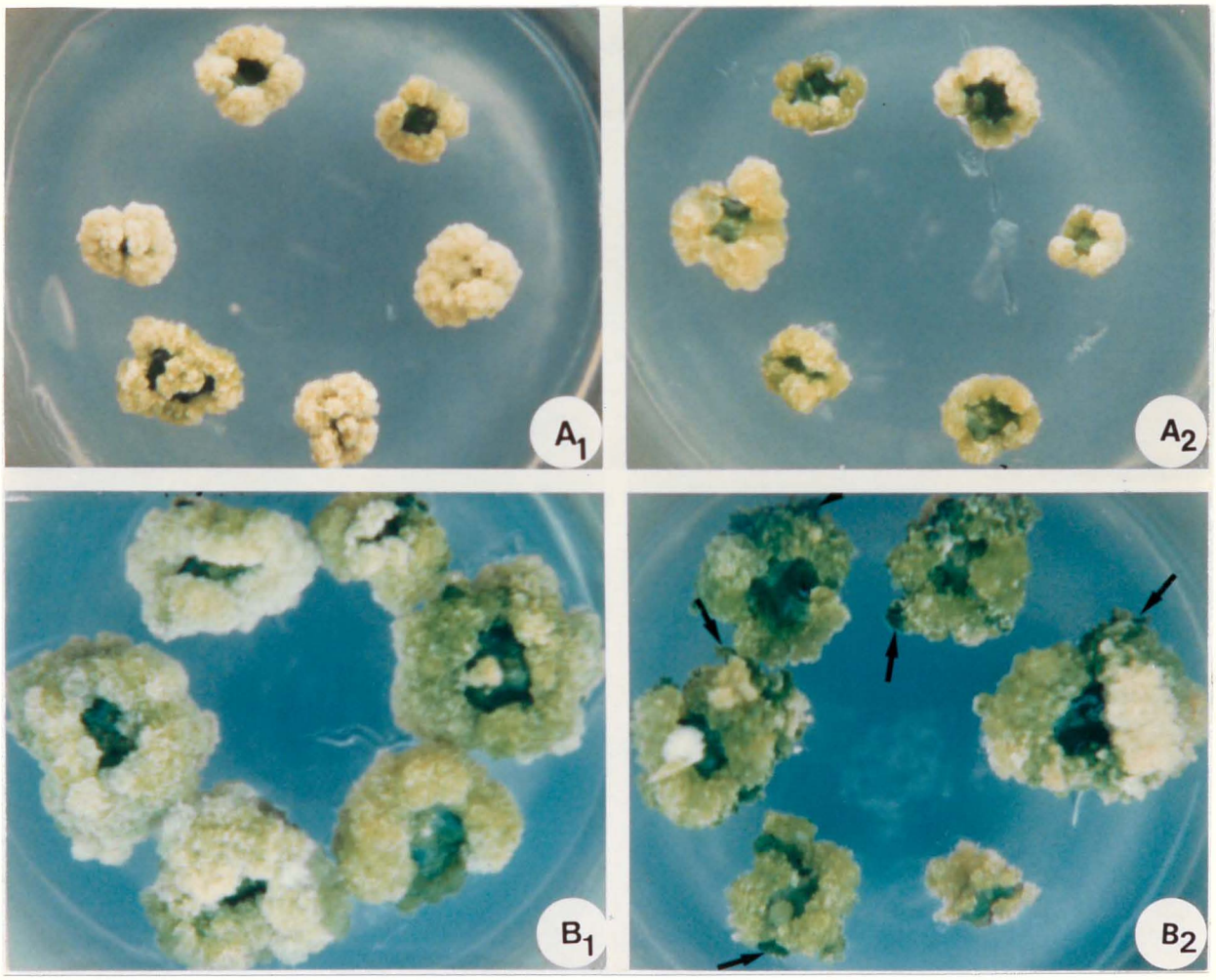
(a) ver em "Material e Métodos" a escala de notas atribuidas às variáveis
(b) número de contrastes que apresentam diferenças estatisticas significativas em um um total de 435 contrastes.
ns = não significativo
* = Significativo a 5%
O valor tabelado para χ^2_{29}; 0,05 = 42,56 e para χ^2_{58}; 0,05 ≃ 79,08.

Verifica-se a partir da Tabela 15 que os meios M_1 e M_3, embora diferentes estatísticamente, tendem a promover respostas semelhantes no que diz respeito ao crescimento e potencial morfogenético em calos neles induzidos. O meio M_3 (MS + 0,5 mg/l NAA + 0,25 mg/l BAP) tem suas concentrações de NAA e BAP reduzidas a metade em relação aquelas do meio M_1 (MS + 1,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP); esta redução é capaz de manter favoravelmente os níveis de crescimento e freqüência de regeneração nos calos induzidos já verificados para o meio M_1 e, com uma vantagem adicional prática que é a

obtenção de respostas morfogenéticas desejáveis utilizando-se concentrações de fitorreguladores menores.

Por outro lado, a Tabela 15 também mostra a existência de diferenças estatísticas significativas entre os meios M_1 e M_2 e M_2 e M_3. O meio M_2 (MS + 4,0 mg/l NAA + 2,0 mg/l BAP) tem suas concentrações de NAA e BAP duplicadas em relação aquelas do meio M_1; este aumento, promove respostas semelhantes ao observado quando o meio de cultura está suplementado com a auxina 2,4-D.

A Figura 5 mostra calos de 15 e 30 dias induzidos nos meios M_1 ($5A_1$ e $5B_1$) e M_2 ($5A_2$ e $5B_2$). Aos 15 dias já é possível notar que os calos induzidos no meio M_2 ($5A_2$) são maiores e mais claros que os calos induzidos no meio M_1 ($5A_1$); aos 30 dias, verifica-se pontos de regeneração nos calos induzidos no meio M_1 (setas, $5A_1$), ao contrário do que ocorre nos calos induzidos no meio M_2 ($5A_2$), os quais mantêm-se indiferenciados.



(A1 e B1) calos respectivamente com 15 e 30 dias de cultura em meio MS + 4,0 mg/l de NAA + 2,0 mg/l BAP; (A2 e B2) calos respectivamente com 15 e 30 dias de cultura em meio MS + 1,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP; setas em 5B2 mostram pontos de regeneração.

Figura 5. Efeito das concentrações de fitorreguladores no meio de indução sobre o crescimento e potencial morfogenético dos calos.

A Tabela 16 mostra novamente a existência de diferenças estatísticas significativas entre genótipos; porém, a interação destes com os meios de cultura é menor do que o observado nos resultados dos dois experimentos anteriores. Possivelmente, o aumento para determinados valores nas concentrações de fitorreguladores, tendem a eliminar o efeito de genótipo, constituindo-se no fator preponderante na determinação das respostas morfogenéticas dos calos.

4.3.4. Análise do efeito dos fitorreguladores NAA e BAP sob duas condições de luminosidade e dos genótipos

Os resultados desta análise são relativos ao experimento 4 do item 3.2.2.3., de "Material e Métodos" e encontram-se nas Tabelas 17 e 18 e Figura 6.

As funções selecionadas para as variáveis peso fresco, número de gemas e/ou brotos (Nº G/B)^{a}, cor^{a} e textura^{a} dos fatores A e B foram Assimetria a Direita (peso fresco e número de gemas e/ou brotos), Escore de Van der Warden (cor) e Escore de Wilcoxon (textura).

Os resultados da aplicação do teste χ^2 com 3 graus de liberdade (α = 0,05) e das comparações múltiplas realizadas para o fator A, encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17. Estatísticas obtidas para o fator A (dois meios de cultura sob duas condições de luminosidade) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo.

VARIÁVEL	VALOR DA ESTATÍSTICA Q	COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS PARA OS NÍVEIS DO FATOR A					
		(M_1-M_2)	(M_1-M_3)	(M_1-M_4)	(M_2-M_3)	(M_2-M_4)	(M_3-M_4)
Peso (g)[a]	155,63*	*	ns	*	*	*	*
Nº G/B[a]	100,60*	*	*	*	*	ns	*
Cor[a]	107,43*	*	*	*	*	*	*
Textura[a]	74,33*	*	ns	*	*	*	*

VARIÁVEL	MÉDIA			
	M_1	M_2	M_3	M_4
Peso (g)[a]	0,231	0,112	0,239	0,090
Nº G/B[a]	0,48	0,00	1,26	0,00
Cor[a]	1,63	1,41	1,93	1,73
Textura[a]	2,10	2,26	2,10	2,05

(a) ver em "Material e Métodos" a escala de notas atribuídas às variáveis

M_1 = MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP (claro)

M_2 = MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP (escuro)

M_3 = MS + 1,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP (claro)

M_4 = MS + 1,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP (escuro)

ns = não significativo

* = Significativo a 5%

O valor tabelado para $\chi^2_{3;\,0,05} = 7,81$.

Os resultados da aplicação do teste χ^2 com 29 graus de liberdade (α = 0,05) e das comparações múltiplas realizadas para o fator B, assim como a aplicação do teste χ^2 com 87 graus de liberdade para a Interação entre os fatores A e B, encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18. Estatística Q obtida para o fator B (30 genótipos) e para a interação AB (dois meios de cultura sob duas condições de luminosidade versus 30 genótipos) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo.

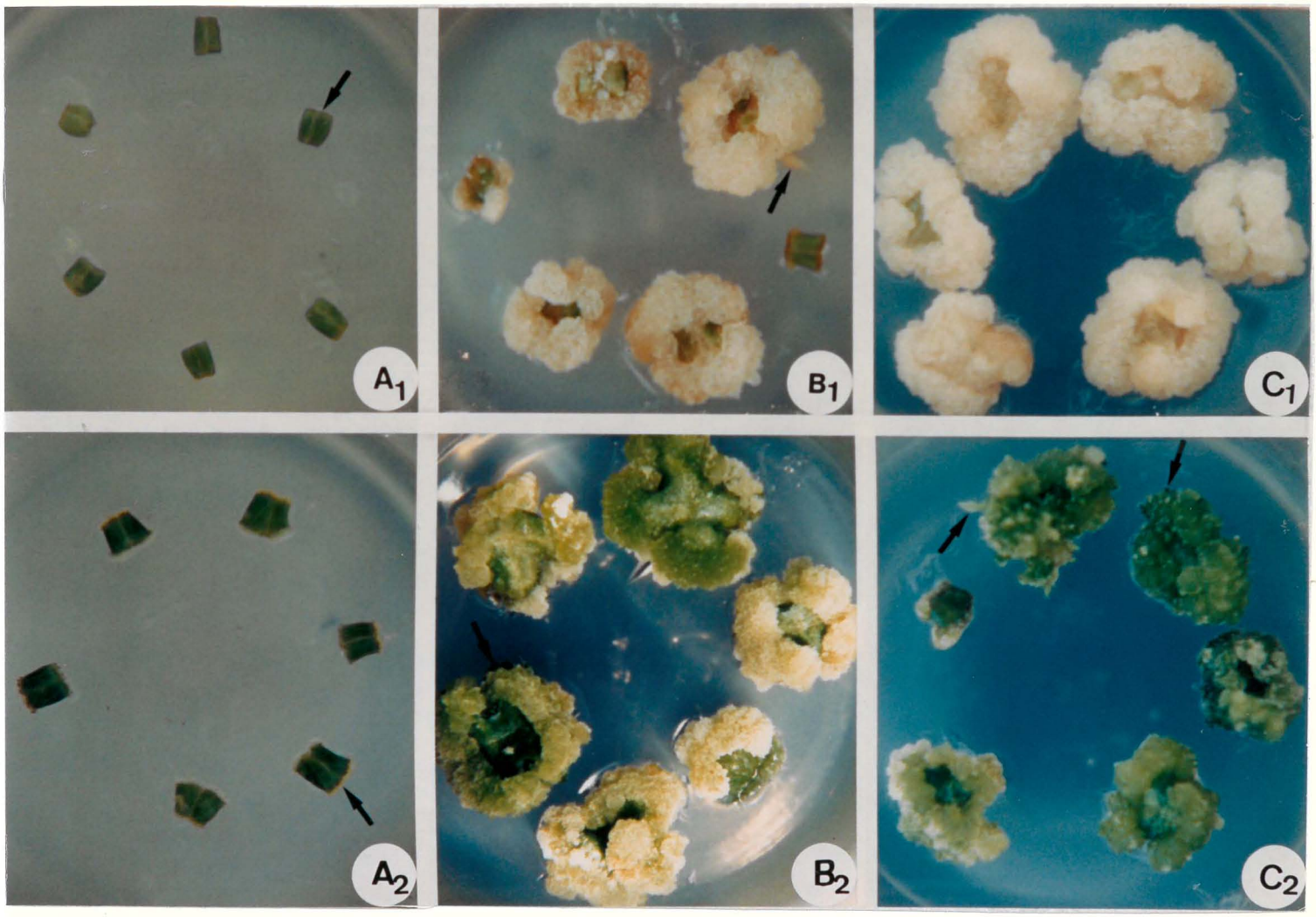
VARIÁVEL	VALOR DA ESTATÍSTICA Q (fator B)	COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS (fator B)[b]		VALOR DA ESTATÍSTICA Q (Interação entre fator A e B)
		Nº	%	
Peso (g)[a]	125,10*	119	27,35	160,31*
Nº G/B[a]	158,86*	155	35,63	161,55*
Cor[a]	151,65*	140	32,18	180,07*
Textura[a]	154,36*	146	33,56	163,39*

(a) ver em "Material e Métodos" a escala de notas atribuidas às variáveis
(b) número de contrastes que apresentam diferenças estatisticas significativas em um um total de 435 contrastes.
* significativo a 5%
O valor tabelado para χ^2_{29}; 0,05 = 42,56 e para χ^2_{87}; 0,05 $\simeq$ 113,14.

A Tabela 17 mostra que todos os meios avaliados diferem estatisticamente entre si; no entanto, as diferenças observadas para os valores médios das variáveis tendem a ser menores entre meios mantidos sob as mesmas condições de luminosidade (fotoperíodo de 16 horas ou escuro contínuo) do que, para um mesmo meio de cultura mantido sob condições de luminosidade distintas.

Na sequência de eventos mostrados na Figura 6, nota-se que a indução de calos em explantes foliares da cultivar IRI 1022 no início é mais lenta naqueles explantes mantidos no escuro contínuo. Com 7 dias de cultivo já é possível visualizar a indução de calos nas regiões de ferimentos em explantes mantidos na luz (seta em $6A_2$); o mesmo não ocorre em explantes mantidos no escuro (seta em $6A_1$). Ao final do período de trinta dias, no entanto, os calos mantidos no escuro alcançam os calos mantidos no claro em relação ao crescimento. Porém, estes calos não são capazes de regenerar partes aéreas ($6B_1$ e $6C_1$) ao contrário daqueles mantidos na luz ($6B_2$ e $6C_2$); eventualmente se observa a diferenciação de raízes nos mesmos (seta em $6B_1$).

A Tabela 18 mostra que os genótipos avaliados também diferem estatisticamente entre si e, que há interação significativa entre os meios de cultura e os genótipos. Assim, as diferenças estatísticas significativas observadas entre os meios de cultura, têm também um componente genotípico.



(A1, B1 e C1) calos respectivamente com 7, 20 e 30 dias de cultura em meio MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP e mantidos sob escuro continuo; a seta em (A1) aponta local de indução de calo no explante e em (B1) a regeneração de raizes observada eventualmente sob escuro continuo; (A2, B2 e C2) calos respectivamente com 7, 20 e 30 dias de cultura em meio MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP e mantidos sob fotoperiodo de 16 horas; a seta em (A2) aponta local de indução de calo no explante; pontos de regeneração nos calos induzidos são mostrados em B2 e C2 (setas).

Figura 6. Efeito da condição de luminosidade sobre o crescimento e potencial morfogenético dos calos.

4.3.5. Análise do efeito de três genótipos SCz e dos fitorreguladores NAA e BAP

Os resultados desta análise são relativos ao experimento 5 do item 3.2.2.3., de "Material e Métodos" e encontram-se nas Tabelas 19 e 20 e Figura 7.

A função selecionada para as variáveis peso fresco, número de gemas e/ou brotos e cor dos fatores A e B foi a Assimetria a Direita e para a variável textura foi a Escore de Wilcoxon.

Os resultados da aplicação do teste χ^2 com 1 grau de liberdade (α = 0,05) para o fator A, encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19. Estatísticas obtidas para o fator A (dois meios de cultura) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo.

VARIÁVEL	VALOR DA ESTATÍSTICA Q	MÉDIA	
		M_1	M_2
Peso (g)[a]	$1,24^{ns}$	0,21	0,20
Nº G/B[a]	$2,27^{ns}$	0,96	1,15
Cor[a]	$5,66^{*}$	1,46	1,61
Textura[a]	$22,02^{*}$	2,24	2,04

(a) ver em "Material e Métodos" a escala de notas atribuidas às variáveis
M_1 = MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP
M_2 = MS + 1,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP
ns = não significativo
* = Significativo a 5%
O valor tabelado para χ^2_1; 0,05 = 3,84.

Os resultados da aplicação do teste χ^2 com 2 graus de liberdade (α = 0,05), para o fator B e para a Interação entre os fatores A e B, encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20. Estatísticas obtidas para o fator B (três genótipos SC2) e para a interação AB (dois meios de cultura versus três genótipos SC2) na avaliação de calos da cv IRI 1022 após 30 dias de cultivo.

VARIÁVEL	VALOR DA ESTATÍSTICA Q (fator B)	COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS		
		G32-G83	G32-G113	G83-G113
Peso (g)[a]	70,93	*	*	*
Nº G/B[a]	103,95	*	*	*
Cor[a]	57,58	*	*	*
Textura[a]	33,87	*	*	*

VARIÁVEL	MÉDIA			VALOR DA ESTATÍSTICA Q (Interação entre fator A e B)
	G32	G83	G113	
Peso (g)[a]	0,098	0,240	0,294	27,00*
Nº G/B[a]	1,23	1,91	0,03	3,00ns
Cor[a]	1,28	2,75	1,23	23,00*
Textura[a]	2,73	1,96	2,78	21,63*

(a) ver em "Material e Métodos" a escala de notas atribuidas às variáveis
ns = não significativo
* = significativo a 5%
O valor tabelado para $\chi^2_{2;\,0,05}$ = 5,99.

Verifica-se a partir da Tabela 19 que os meios M_1 e M_2 não diferem estatisticamente para as variáveis peso fresco e número de gemas e/ou brotos (Nº G/B), isto é, para as variáveis que expressam diretamente o crescimento e o potencial morfológico dos calos induzidos. No entanto, estes meios diferem entre si já que, diferenças estatísticas significativas foram encontrados para as variáveis cor e textura.

Os resultados apresentados na Tabela 20, mostram por sua vez que para todos os contrastes realizados entre os genótipos G32, G83 e G113, foram encontradas diferenças estatísticas significativas.

Através da Tabela 20 podemos observar ainda que os calos oriundos do genótipo G32 tendem a apresentar crescimento (valor peso fresco em gramas ≃ 0,100) e regeneração (valor Nº G/B = 1, isto é, de 0 a 5 gemas e/ou brotos por calo) reduzidos, além de coloração verde esbranquiçado (valor cor = 1) e textura compacta (valor textura = 3); os calos do genótipo G83 tendem a apresentar crescimento dentro da média verificada para os calos neste estudo (valor peso fresco em gramas = 0,240) e, a freqüência mais alta de regeneração observada entre os três genótipos sob avaliação (valor Nº G/B = 2, isto é, 6 a 10 gemas ou brotos por calo) além de, coloração verde médio (valor cor = 3) e textura intermediária (valor textura = 2) e os calos do genótipo G113 tendem a apresentar o maior crescimento observado entre os três genótipos sob avaliação (valor peso fresco em gramas

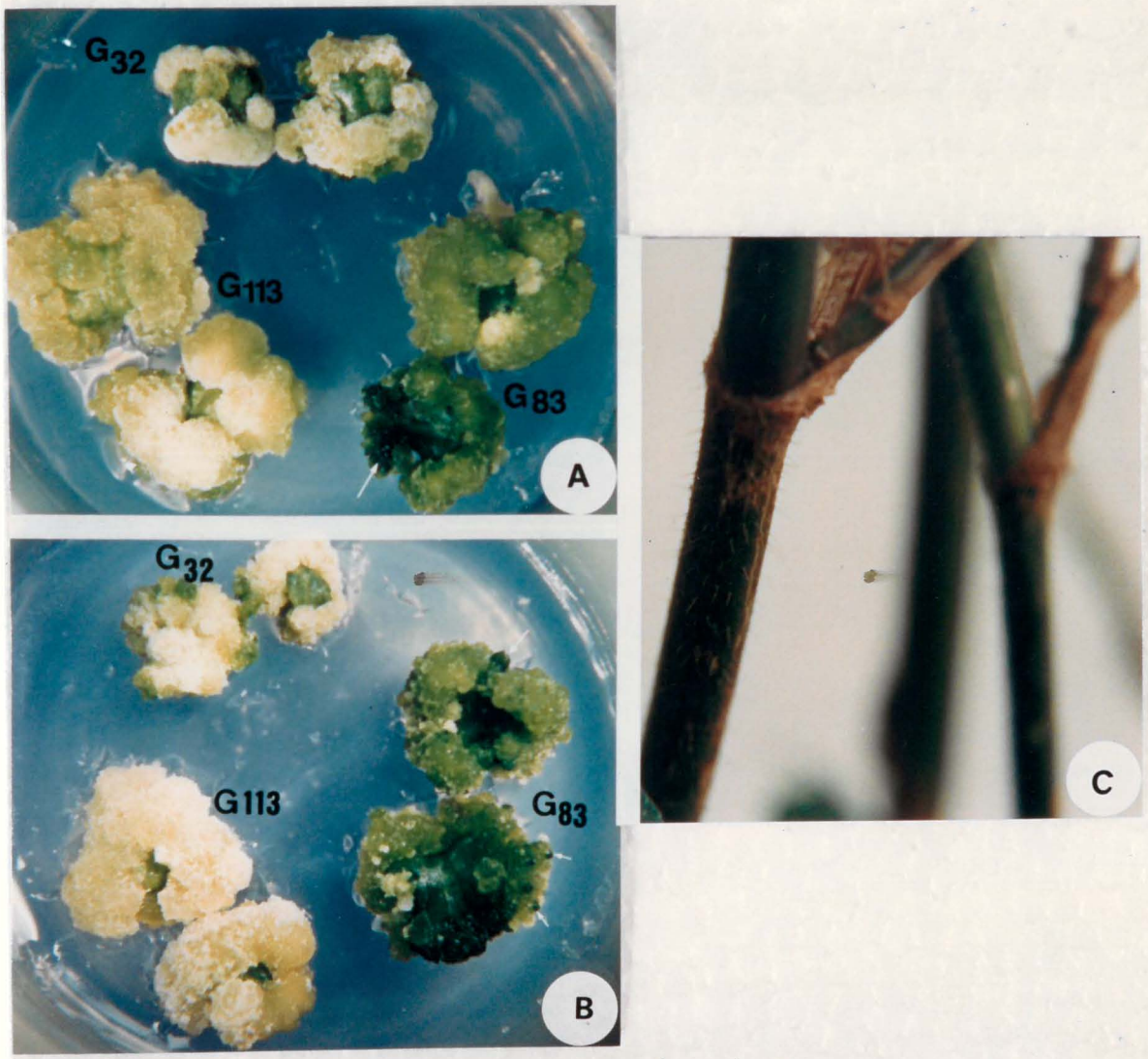
= 0,294) e a freqüência de regeneração mais baixa (valor Nº G/B = 0) além de, coloração verde esbranquiçado (valor cor = 1) e textura compacta (valor textura = 3).

Em relação a variável "número de gemas e/ou brotos" a não detecção de diferenças estatísticas significativas, neste estudo, entre meios de cultura (Tabela 19) e para a Interação entre os fatores A (meio de cultura) e B (genótipos) mas sim entre genótipos (Tabela 20) confirma que as respostas obtidas em termos de potencial regenerativo devem-se aqui, exclusivamente ao fator genótipo.

Na descrição apresentada acima dos calos pertencentes aos genótipos G32, G83 e G113, fica evidente que o genótipo G83, apresenta capacidade regenerativa distinta e superior aos dois outros.

A Figura 7 mostra calos obtidos a partir de três genótipos SCz - G32, G83 e G113 - após 30 dias de cultura em 2 meios de indução (7A e 7B).

Nota-se a partir desta figura que os calos de mesmo genótipo tendem a manter o mesmo comportamento em relação ao crescimento e potencial morfogenético em meios de cultura diferentes; porém, calos de genótipos diferentes apresentam respostas bem distintas entre si, em relação a estes parâmetros, mesmo dentro de um mesmo meio de cultura.



(A) calos induzidos em meio MS + 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP; (B) calos induzidos em meio MS + 1,0 mg/l NAA + 0,4 mg/l BAP. Observa-se que em ambos os meios os calos de cada genótipo mantêm entre si, distintos comportamentos em relação ao crescimento e potencial morfogenético; (C) presença de cerdas nos ramos da planta SC1 83).

Figura 7. Crescimento e potencial morfogenético apresentado por calos oriundos de três genótipos SC_2 (G32, G83 e G113) e característica vegetativa apresentada por planta parental SC_1 (G83).

Estes genótipos são progênies respectivamente de três plantas SC_1, que compunham o grupo das 88 plantas mencionadas no item 4.2. de "Resultados e Discussão", as quais, ~~e que~~ foram avaliadas em relação a alguns aspectos morfológicos e fisiológicos.

As plantas SC_1 parentais foram selecionadas aleatoriamente, com base apenas na produtividade de sementes; no grupo das 88 plantas estavam entre aquelas que apresentavam os maiores índices individuais de produtividade de sementes no período de coleta realizada entre abril a agosto de 1990:

SC_1 32 = 66 sementes

SC_1 83 = 115 sementes

SC_1 113 = 268 sementes

Em relação a parte vegetativa, a única variação detectada entre estas plantas SC_1 e aquelas oriundas de sementes e não submetidas ao cultivo *in vitro* foi a presença de cerdas nos ramos da planta SC_1 83 (Figura 7C). Como mencionado no item 4.2. de "Resultados e Discussão", apenas as plantas pertencentes a um dado genótipo denominado B8.1 apresentaram tal característica, logo, esta planta pertencia a este genótipo.

Quanto ao histórico *in vitro* destas plantas parentais SC_1, elas foram regeneradas a partir de calos induzidos em meios MS suplementados com diferentes concentrações de NAA e BAP:

SC_1 32 : MS + 1,0 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP

SC_1 83 : MS + 1,0 mg/l NAA + 2,0 mg/l BAP

SC_1 113 : MS + 2,0 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP

Sementes (progênies) destas plantas parentais foram postas para germinar para se obter plântulas e destas, explantes foliares.

A taxa de germinação observada para 35 sementes de cada planta parental foi 100%. Na progênie G32 verificou-se que, das 35 sementes germinadas 29% eram albinas.

Tudo indica que assim como o observado em alfafa (BINGHAM *et alii*, 1975), o caráter regeneração *in vitro* deva ser altamente herdável na espécie *S. guianensis* e, através de seleção recorrente aplicada a genótipos selecionados para este caráter poderá ser possível melhorar a capacidade de regeneração de uma população; ademais, genótipos altamente regenerativos podem ser obtidos em todas as cultivares desde que um número suficiente de plantas seja avaliado.

4.4. Estudo Histológico dos Calos

Este estudo foi realizado com o intuito de se verificar a nível estrutural os eventos iniciais da indução de calos em explantes foliares de *S. guianensis*, cultivar IRI 1022, bem como as proliferações e as diferenciações celulares ocorridas nestes calos ao longo de 30 dias de

cultura em meio MS suplementado com 2,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP.

A escolha desse meio de indução foi baseada na sua capacidade, observada em etapas anteriores do presente estudo, em promover a indução e o crescimento de calos, assim como, a indução de regeneração nos mesmos.

A Figura 9 mostra inicialmente a caracterização destes processos a nível da morfologia externa. Explantes foliares colocados em meio MS + 2,0 mg/l de NAA + 1,0 mg/l BAP e mantidos sob fotoperíodo de 16 horas de luz e temperaturas entre 25-28°C (9A) iniciam o processo de indução de calos, o qual já se faz notar nas regiões de ferimento dos explantes, no 5º dia de cultura (seta em 9B); com 7 dias de cultura este processo é mais visível (seta em 9C); com 10 dias de cultura os calos apresentam um crescimento maior nas regiões dos ferimentos (8D); com 15 dias de cultura os calos apresentam um crescimento maior mas pontos de regeneração ainda não são visualizados (8E); com 20 dias de cultura os pontos de regeneração são visualizados nos calos (seta em 8F); com 25 e 30 dias de cultura (8G e 8H respectivamente) os pontos de regeneração se acentuam. Calos transferidos para meio de regeneração (meio MS suplementado com 1,0 ou 2,0 mg/l de BAP, e mantidos sob as condições de luminosidade e temperatura mencionadas acima) apresentam organogênese acentuada de partes aéreas (brotos) (8I).

A análise a nível anatômico, no entanto, foi realizada em calos mantidos apenas em meio de indução (30

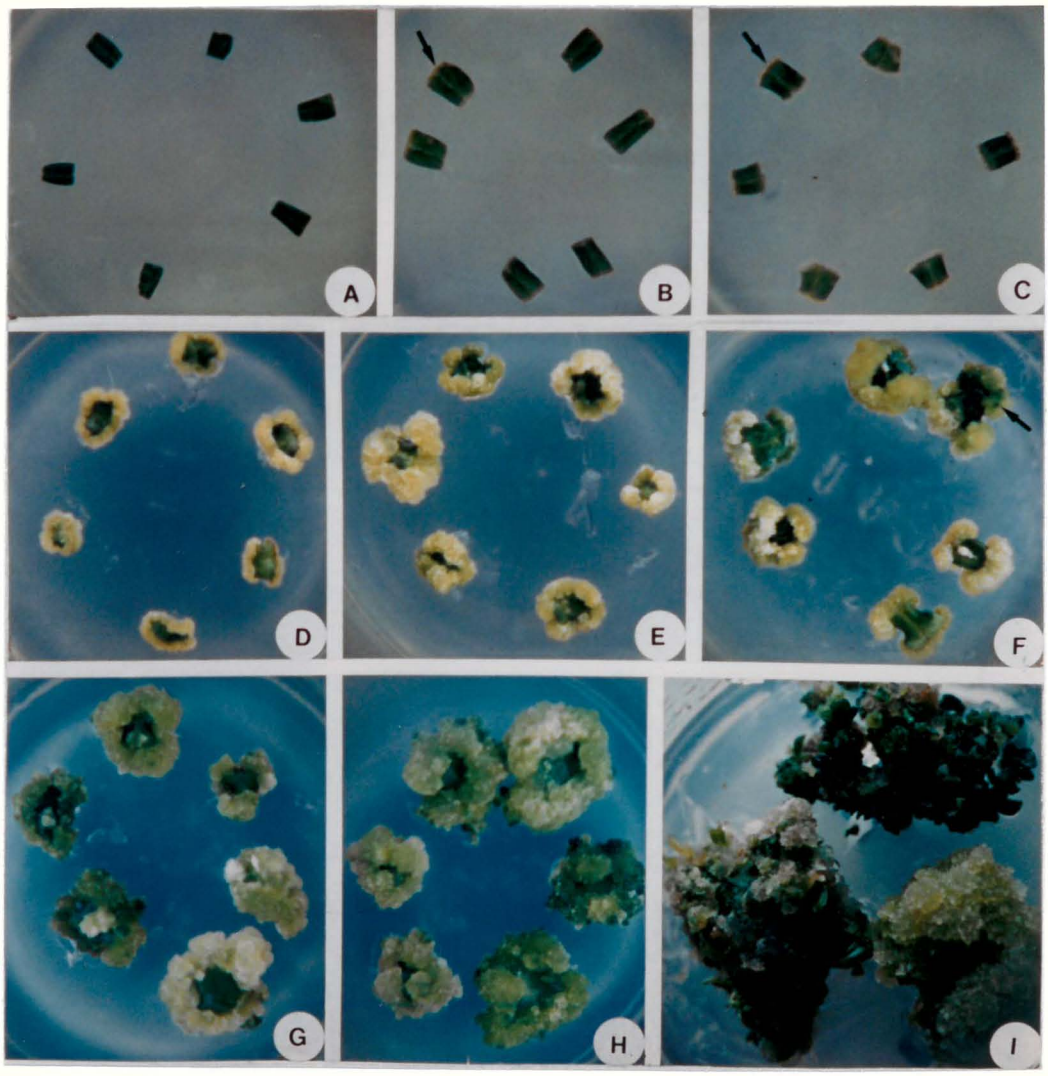
dias iniciais de cultura).

A Figura 9 mostra inicialmente o padrão de organização ao nível da nervura central visto em cortes transversais de folíolos de plantas germinadas a partir de sementes da cv IRI 1022 cultivadas na natureza (9A e 9C) e *in vitro* (9B e 9D), assim como, o detalhe de um tricoma na epiderme abaxial (9E) e de estômatos do tipo paracítico (9F).

Observa-se que as folhas de plantas mantidas na natureza, apresentam células esclereficadas (tecido de sustentação) mais desenvolvidas, na base do feixe da nervura central do que as folhas de plantas e mantidas *in vitro*. Além disso, foi observado que a intensidade de coloração do parênquina clorofiliano (parênquina paliçadico), também é maior nos folíolos da planta mantida na natureza. É provável que essas folhas apresentem uma quantidade maior de clorofila e de amido de assimilação. A presença de tricomas em maior número nos folíolos das plantas mantidas na natureza, por sua vez, pode estar relacionada com a defesa de pragas.

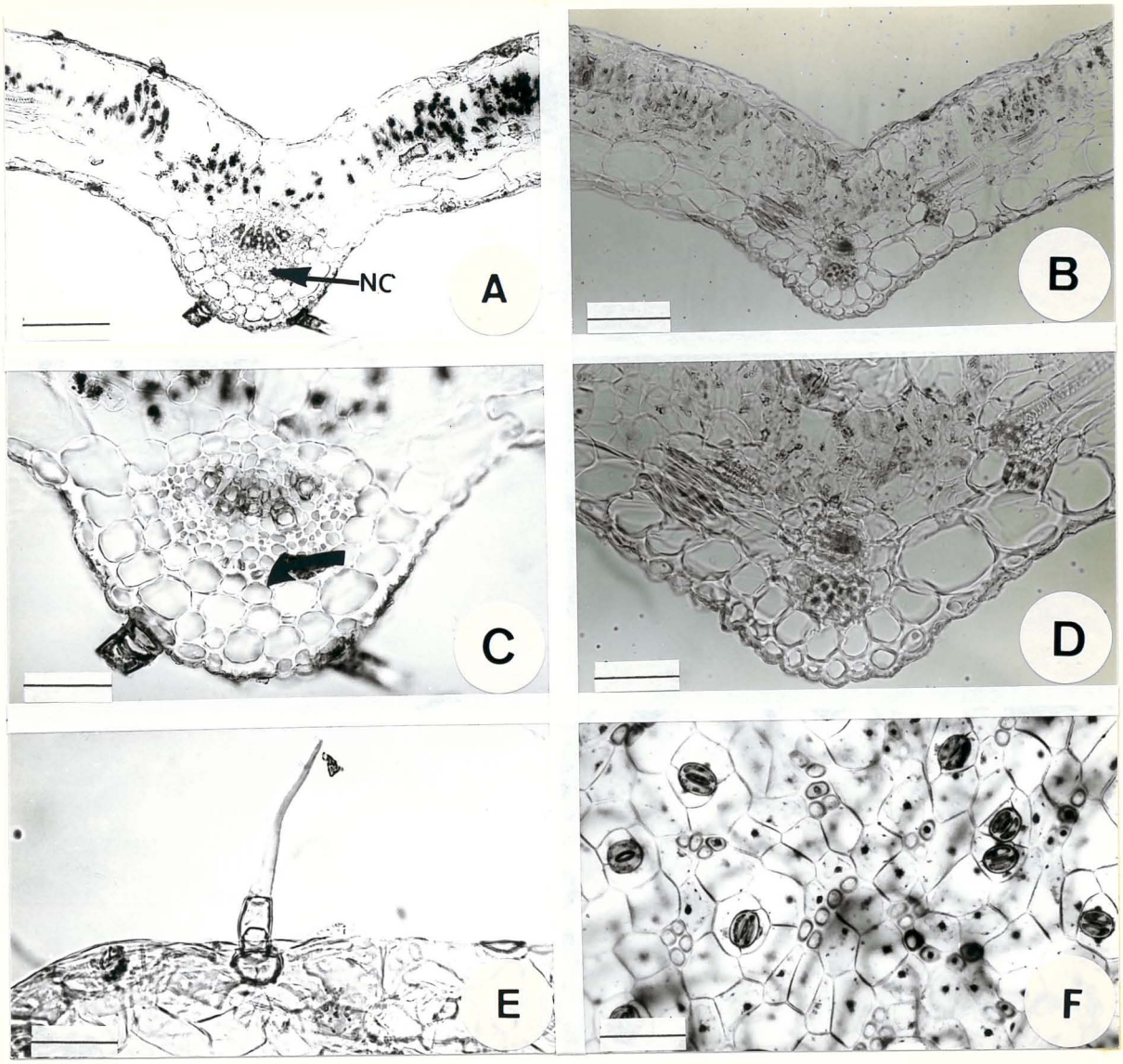
A Figura 10 caracteriza o explante foliar, obtido de plantas oriundas de sementes e mantidas *in vitro*: inicialmente é mostrado o parênquima esponjoso em material dissociado (10A); a terminação de uma nervura onde se vêem as traqueídes e células parênquimáticas (bainha do feixe) envolvendo os elementos traqueais é mostrada em (10B); traqueídes curtas com espessamento escalariforme/espiralado e traqueídes longas com espessamento espiralado/anelado, são

mostradas respectivamente em (10C e 10D); elementos de vaso com espessamento espiralado e espiralado/escalariforme são mostrados respectivamente em (10E e 10F). No explante foliar os elementos de vaso com espessamento reticulado também são observados. Do ponto de vista evolutivo, as traqueídes são mais primitivos que os elementos de vaso, pois desempenham as funções de sustentação e de condução. Os elementos de vaso por sua vez, desempenham apenas função de condução sendo portanto mais eficientes nesta atividade.



(A) explantes foliares no dia 0 de cultura; (B) a seta mostra início de indução visível de calos, nas regiões de ferimento dos explantes, no 5º dia de cultura; (C) com 7 dias de cultura a indução se torna mais visível (seta); (D e E) com 10 e 15 dias de cultura, respectivamente, os calos já são estruturas definidas porém não apresentam indícios de regeneração; (F, G e H), calos com 20, 25 e 30 dias em cultura, respectivamente, apresentam início e desenvolvimento de regeneração; (I) calos transferidos para meios de regeneração, acentuam a organogênese de partes aéreas (brotos).

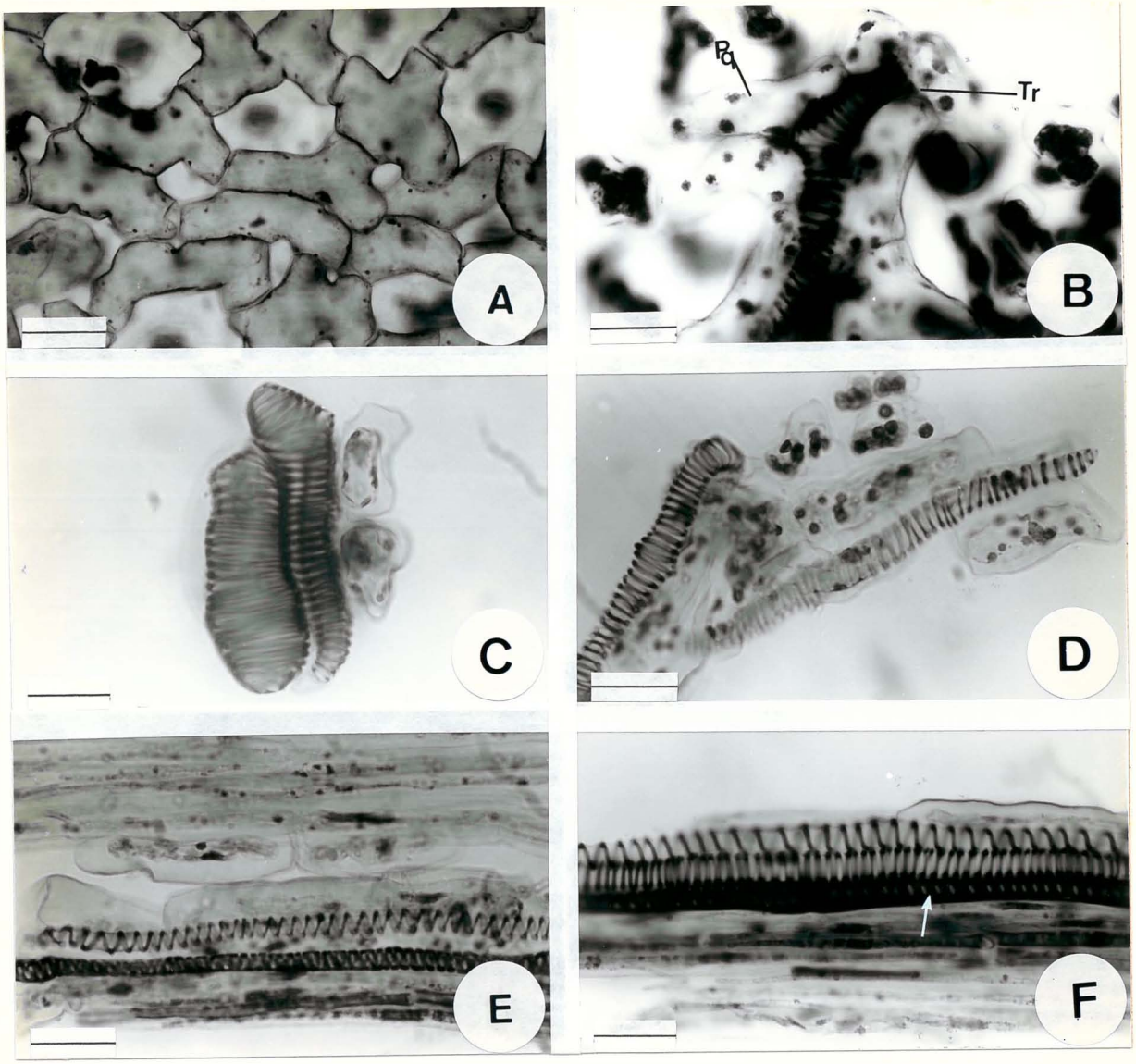
Figura 8. Caracterização a nível da morfologia externa do desenvolvimento de calos mantidos em meio de indução.



(A e C) cortes transversais ao nivel da nervura central (NC) de foliolos de plantas germinadas a partir de sementes e mantidas na natureza; a seta em (C) mostra um colênquima mais desenvolvido ao nivel da nervura central; (B e D) cortes transversais de foliolos de plantas germinadas a partir de sementes e mantidas *in vitro*; (E e F) epiderme abaxial; (E) detalhe de tricoma; (F) estômatos do tipo paracitico em vista frontal.

As barras da Figura 9 (A, B, C, D, E e F) correspondem respectivamente a 100, 100, 50, 50, 50 e 50 μm.

Figura 9. Aspectos estruturais dos folíolos de *Stylosanthes guianensis* cv IRI 1022.



(A) parênquima esponjoso; (B) terminação de nervura onde se vê as traqueídes (Tr) e células parenquimáticas (Pq) envolvendo os elementos traqueais (bainha do feixe); (C) traqueídes curtas com espessamento escalariforme/espiralado; (D) traqueídes mais alongados com espessamento anelado e espiralado; (E) elementos traqueais com espessamento espiralado; (F) elementos traqueais com espessamento espiralado/escalariforme (seta).

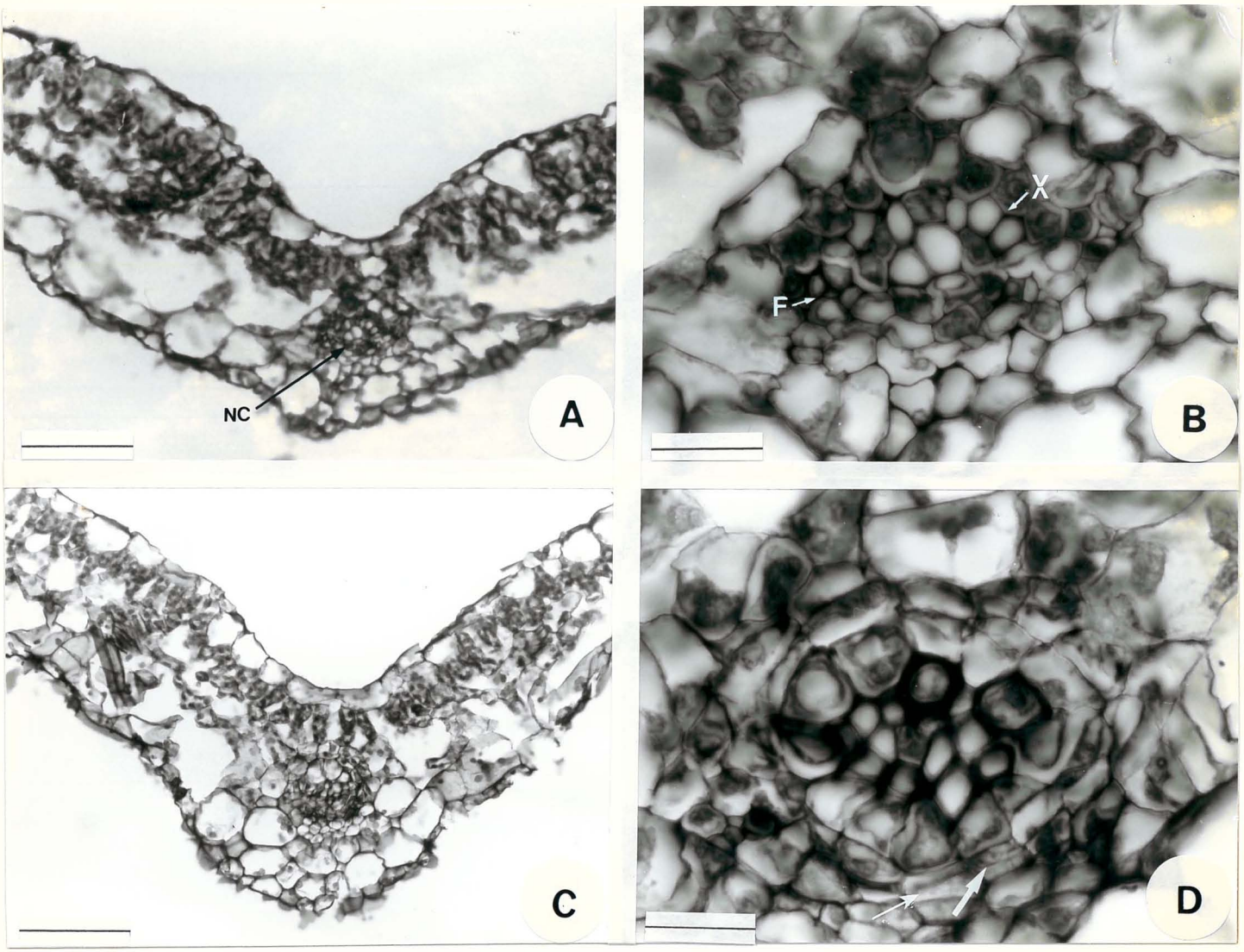
As barras da Figura 10 (A, B, C, D, E e F) correspondem respectivamente a 50, 20, 20, 20, 20 e 20 μm.

Figura 10. Aspectos estruturais do explante foliar obtido de planta germinada a partir de semente e mantida *in vitro*.

A análise dos elementos celulares presentes em calos submetidos a dissociação revela que não ocorre a formação de novas estruturas nestes, porém, a freqüência de alguns elementos mostra-se alterada. As traqueídes foram encontradas em grande número no material dissociado e, uma provável explicação para este fato pode estar relacionada com a alta eficiência destas estruturas em condições de estresse (BURGES, 1989) o que é característico no cultivo *in vitro*.

As Figuras 11 e 12 mostram as modificações ocorridas no explante foliar com 2 dias de cultura, em corte transversal e longitudinal respectivamente ao nível da nervura central. Os principais eventos ocorridos neste período e que levam a indução de calos são as divisões das células do parênquima vascular (principalmente parênquima do floema) e da bainha do feixe, dando início portanto, a proliferação celular.

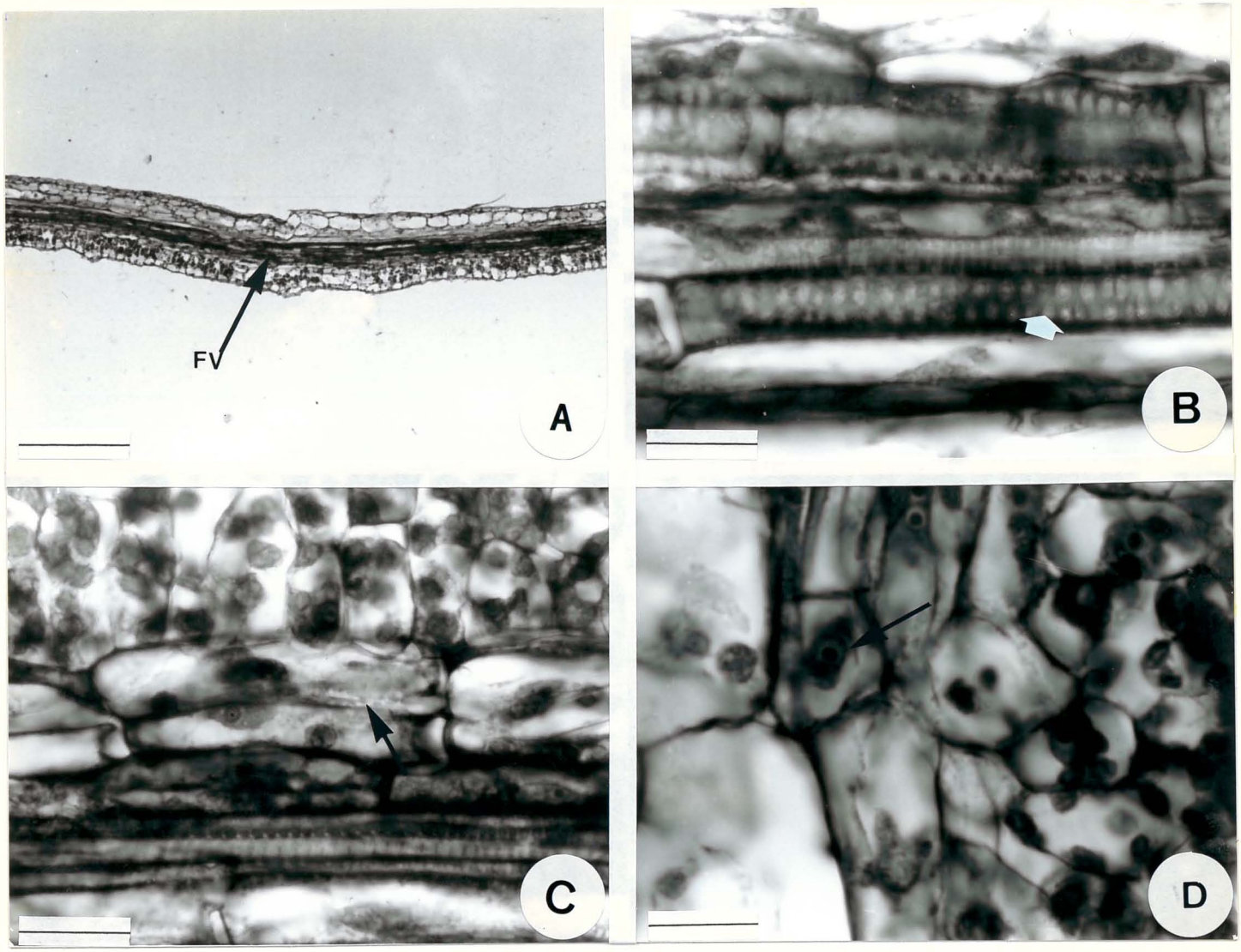
A Figura 13 mostra o explante foliar com 3 dias de cultura. Em cortes longitudinais é possível verificar que próximo a região do ferimento, na epiderme em contato com o meio de cultura e principalmente no parênquima esponjoso (13A e 13B) a ocorrência de intensa proliferação celular. Na região intermediária entre as extremidades feridas do explante, nesta idade, não são observadas alterações na epiderme e/ou mesófilo (13C), nem mesmo a nível das nervuras laterais (13D).



(A) aspecto geral do explante na porção mais interna; seta mostra região da nervura central (NC); (B) detalhe da nervura central com elementos do xilema (X) e do floema (F); (C) aspecto geral do explante na porção mais externa; seta mostra a região da nervura central (NC); (D) detalhe da nervura central; as setas mostram células parenquimáticas próximas ao floema em inicio de divisão.

As barras da Figura 11 (A, B, C e D) correspondem respectivamente a 100, 100, 20 e 20 μm.

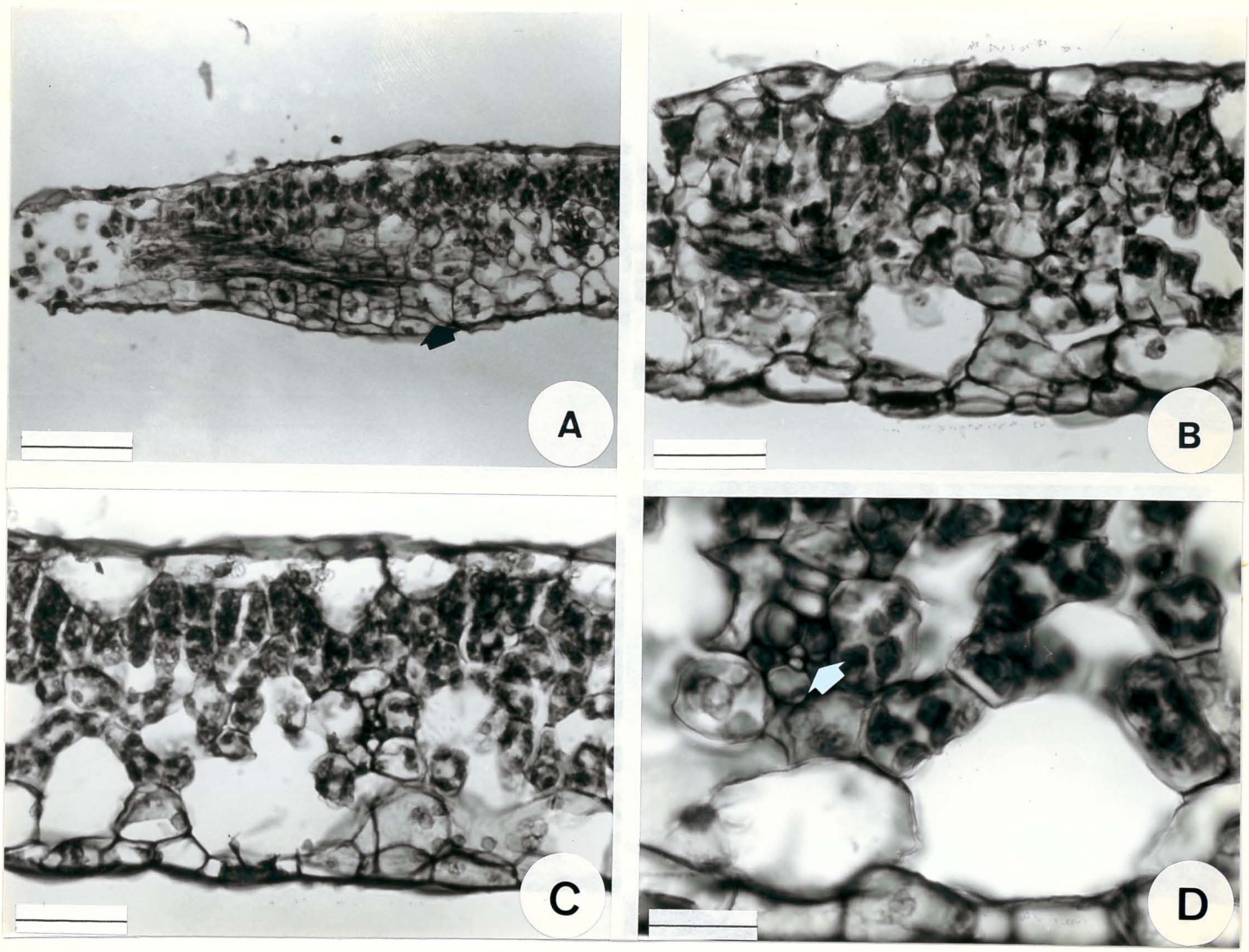
Figura 11. Cortes transversais dos explantes foliares com 2 dias de cultura *in vitro*.



(A) aspecto geral do explante a nivel da nervura central; (B) detalhe dos elementos de vaso; seta mostra espesssamento reticulado; (C) detalhe das células da bainha do feixe já divididas (seta); (D) células da bainha do feixe vascular (seta) apresentando núcleo e nucléolo bem evidentes.

As barras da Figura 12 (A, B, C e D) correspondem respectivamente a 500, 20, 20 e 20 μm.

Figura 12. Cortes longitudinais dos explantes foliares com 2 dias de cultura *in vitro*.



(A) aspecto geral do explante nas proximidades da região do ferimento. Observe a proliferação celular na porção do explante em contato com o meio (seta); (B) a proliferação celular é observada ainda na região do ferimento, em células do parênquima esponjoso; (C) nas porções mais distantes fisicamente do local de ferimento, não se verificam alterações; (D) detalhe do feixe lateral sem sofrer alterações.

As barras da Figura 13 (A, B, C e D) correspondem respectivamente a 500, 20, 20 e 20 μm.

Figura 13. Cortes longitudinais dos explantes foliares com 3 dias de cultura *in vitro*.

A Figura 14 mostra o explante foliar com 4 dias de cultura. O aspecto geral do explante em corte transversal (14A), mostra que no todo ele ainda não sofreu grandes alterações, a exceção, do feixe da nervura central (14B) que se mostra grandemente alterado em função das divisões celulares que continuam ocorrendo no parênquima vascular, na bainha do feixe e no colênquima. Em cortes longitudinais, por outro lado, é possível perceber a formação de um tecido cicatricial na região do ferimento (14C e 14 D) por divisão das células do parênquima clorofiliano e da espiderme.

A Figura 15 mostra o explante foliar com 5 dias de cultura e a existência de um verdadeiro calo. A visão geral do explante em corte longitudinal, evidencia que os calos induzidos restringem-se ainda as extremidades do mesmo. Neste estágio e nesta região, não mais se observa o padrão original do explante (15B); observa-se ainda que elementos traqueais se diferenciaram no interior desta massa de células em proliferação (15C e 15D).

Com 7 dias de cultura já se observa no explante foliar que o calo está induzido (Figura 16). Através de cortes longitudinais é possível verificar que o calo apresenta uma grande quantidade de elementos traqueais neoformados (16A, 16B e 16C). Estes elementos traqueais têm origem por transdiferenciação, pois tecidos procambiais não são observados; estes elementos localizam-se até próximo a periferia do calo (seta em 16B) estando ou não conectados aos antigos elementos traqueais do explante. Em (16D) obser-

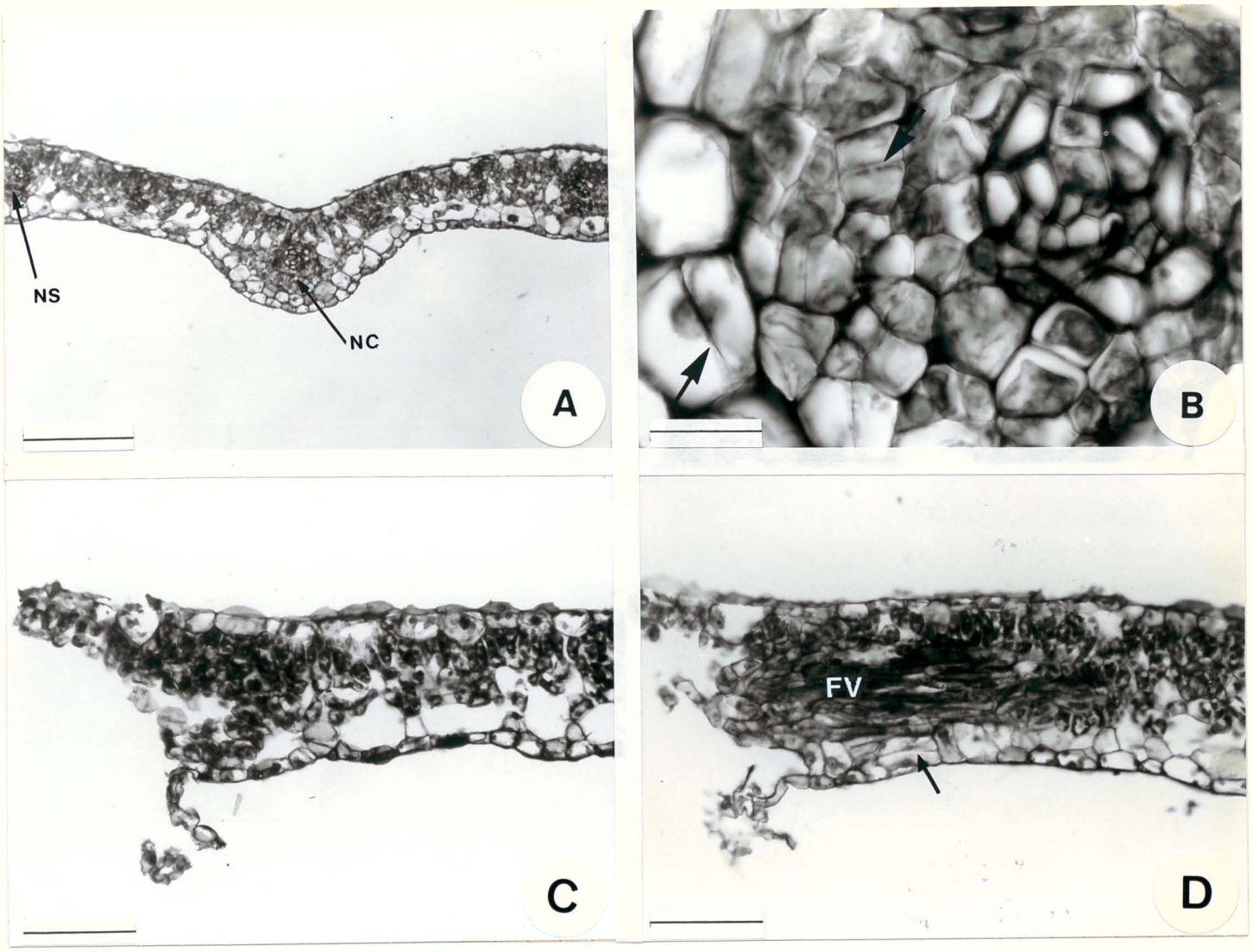
va-se em detalhe a epiderme em divisão.

Cortes longitudinais de calos com 10 dias de cultura são vistos na Figura 17. Nota-se nas células meristemáticas a formação de primórdios de gemas (meristemóides) (setas em 17A e 17C). Tais meristemóides localizam-se principalmente na região periférica dos calos e associados a eles existem elementos traqueais (setas em 17B e 17D).

A Figura 18 mostra cortes transversais de calos contando 25 dias de cultura. Observa-se a indução dos calos nas regiões mais periféricas do explante (próximas as regiões onde havia ferimento) e na região da nervura central (18A); nas regiões mais periféricas do calo, células meristemáticas formam primórdios de gemas que diferenciam-se em gemas (18B) são chamados "pontos de regeneração". Nas porções mais internas do explante, no entanto, observa-se a formação de calos apenas nas extremidades e não a nível da nervura central (18C), embora esta seja bastante modificada pela proliferação dos diversos elementos vasculares do feixe. É possível observar também a proliferação celular na epiderme adaxial, possivelmente onde ocorreu um ferimento (seta).

Em (18D) observa-se ainda as modificações na região de transição entre o restante do explante e o calo.

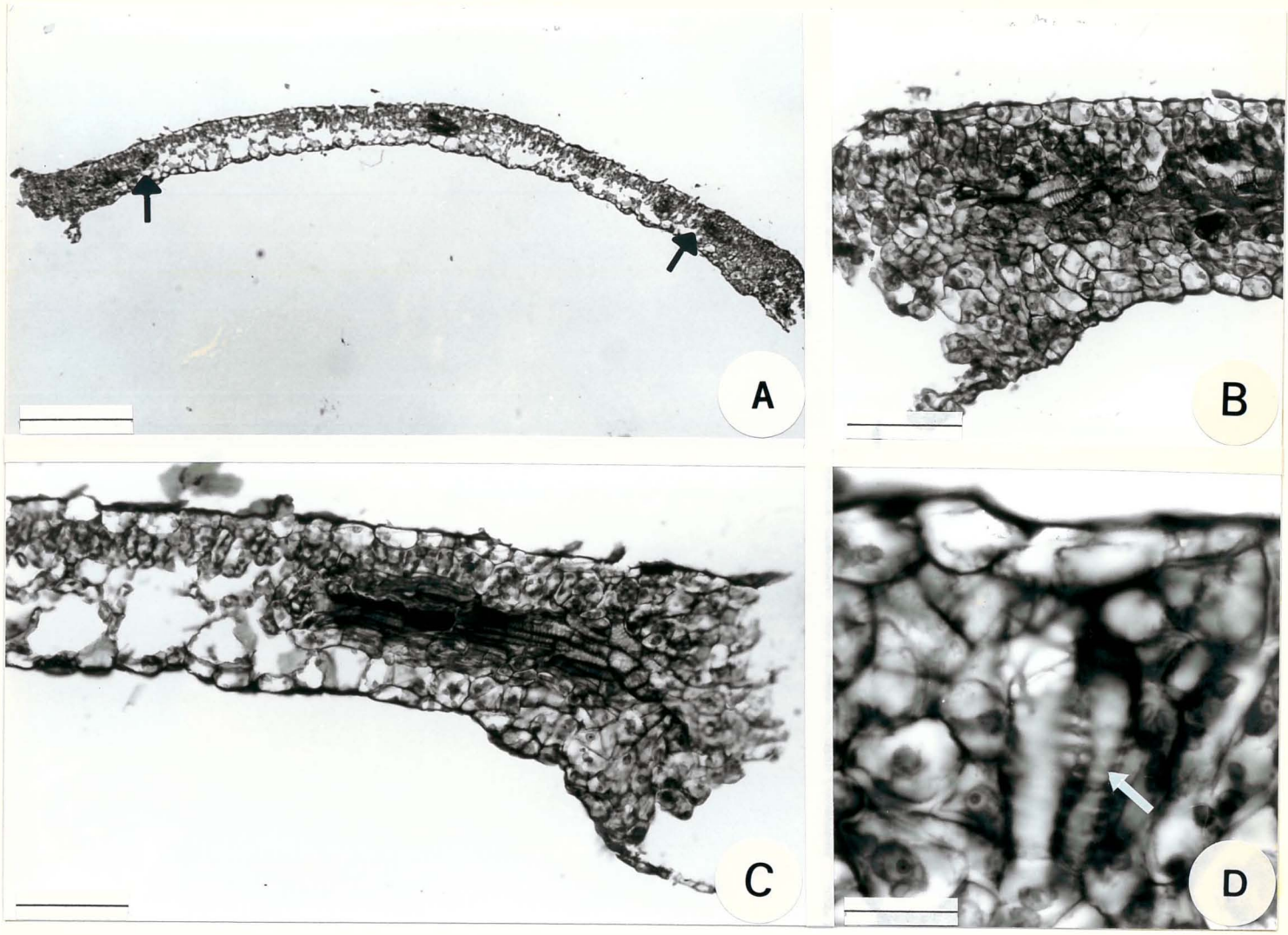
A Figura 19 mostra cortes transversais de calo com 30 dias de cultura.



(A) aspecto geral do explante em corte transversal. As setas apontam a nervura central (NC) e a nervura lateral (NS); (B) detalhe da nervura central, a qual já se encontra completamente alterada, as setas apontam células do parênquima vascular próximas ao floema e do colênquima recém divididas; (C) corte longitudinal na região do ferimento mostrando um tecido de cicatrização; (D) a seta indica células da epiderme em divisão.

As barras da Figura 14 (A, B, C e D) correspondem respectivamente a 200, 20, 100 e 10 μm.

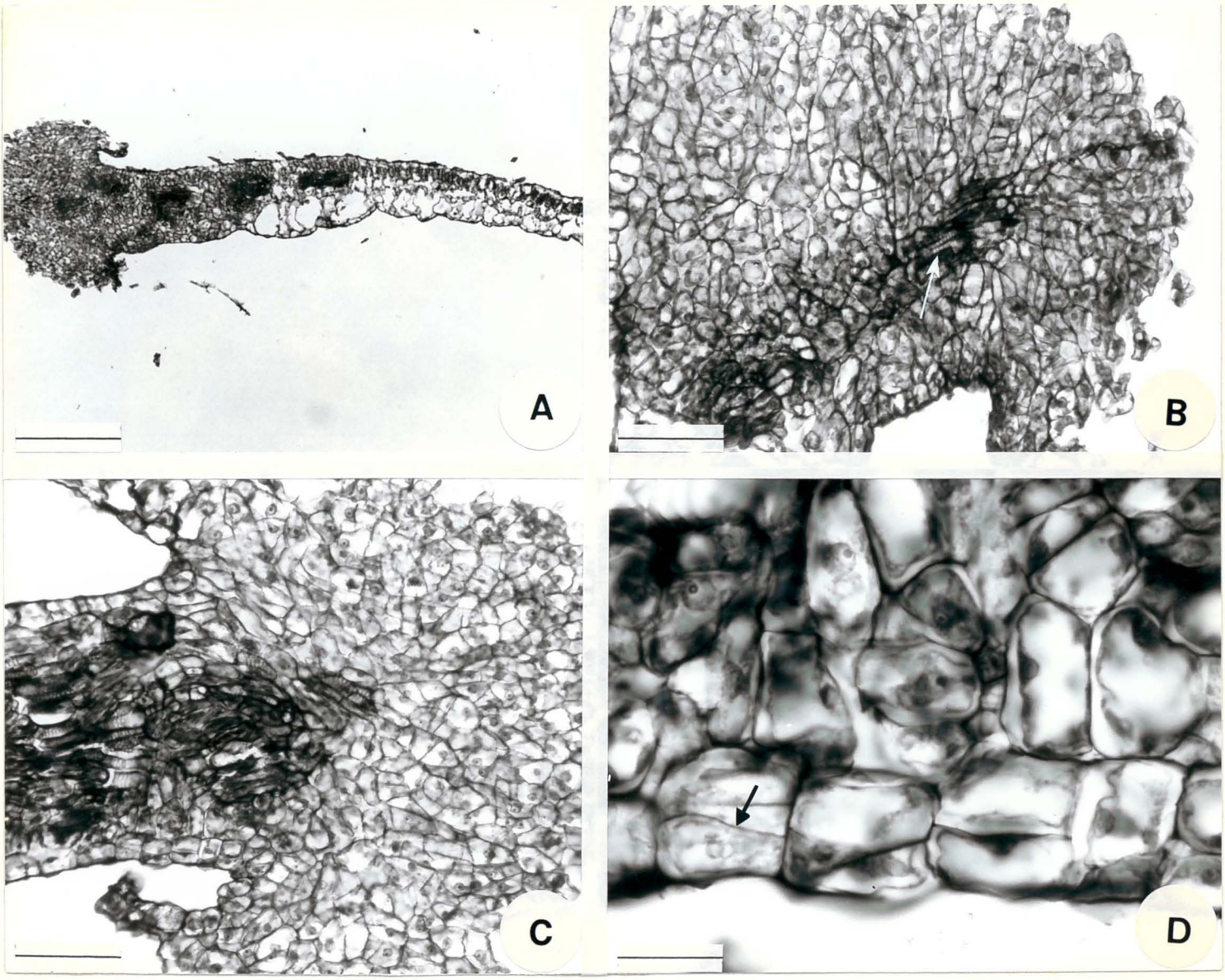
Figura 14. Cortes transversais e longitudinais dos explantes foliares com 4 dias de cultura *in vitro*.



(A) aspecto geral do explante; as alterações ocorridas nas regiões de ferimento já caracterizam a formação de um calo; (B e C) detalhe em maior aumento de ambas as extremidades do explante onde o calo está formado; (D) detalhe em maior aumento mostra elementos traqueais diferenciados próximos à epiderme na massa de células em proliferação (calo).

As barras da Figura 15 (A, B, C e D) correspondem respectivamente a 500, 100, 100 e 20 μm.

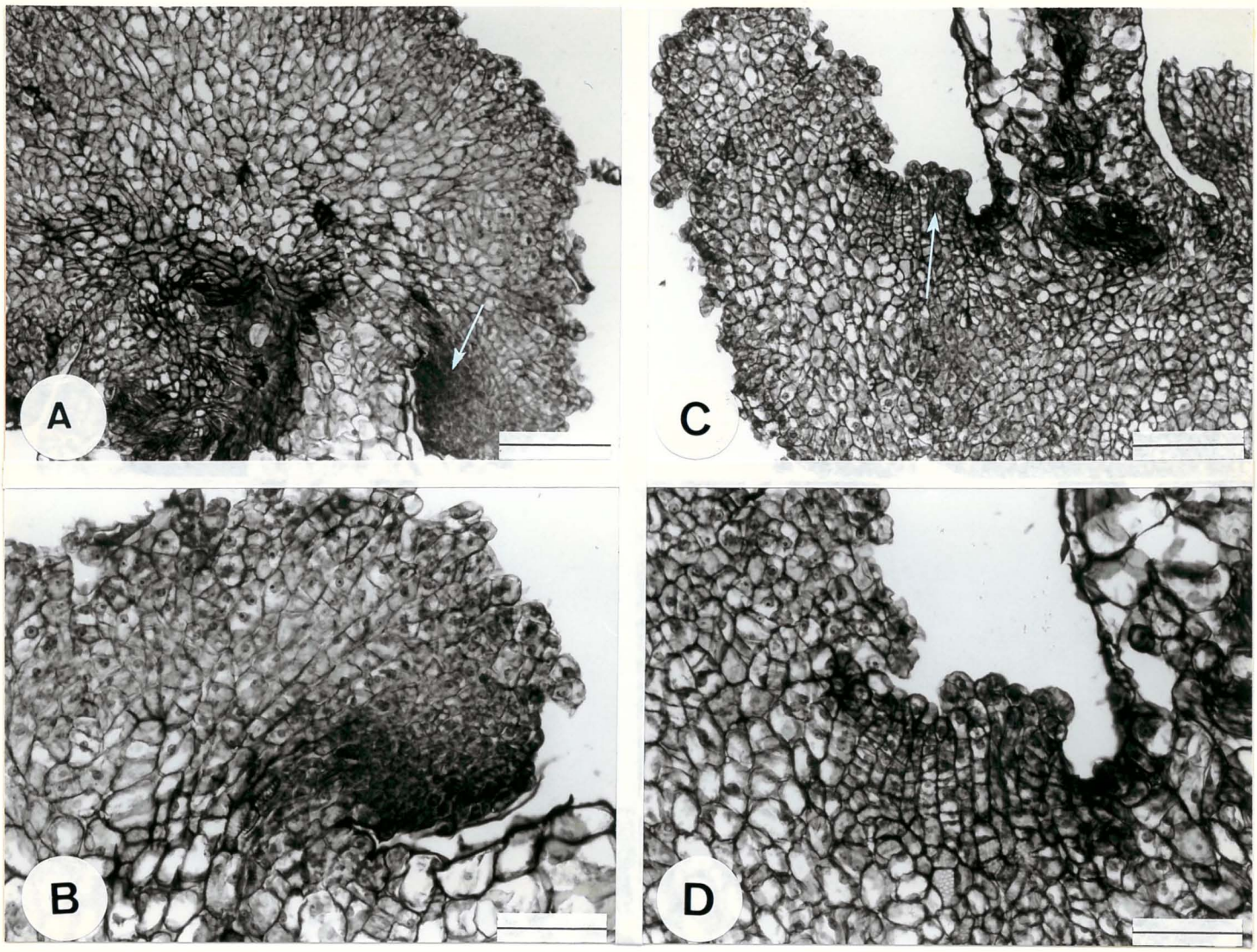
Figura 15. Cortes longitudinais dos explantes foliares com 5 dias de cultura *in vitro*.



(A) aspecto geral do explante e do calo; nota-se a grande proliferação de células meristemáticas e dos elementos traqueais das nervuras laterais; (B) detalhe em maior aumento do calo; os elementos traqueais dispõem-se até as porções mais periféricas do calo (seta); (C) detalhe da região de transição entre o explante e o calo; (D) detalhe em maior aumento mostra a epiderme em divisão (seta), na região de transição entre o calo e o explante.

As barras da Figura 16 (A, B, C e D) correspondem respectivamente a 500, 100, 100 e 20 μm.

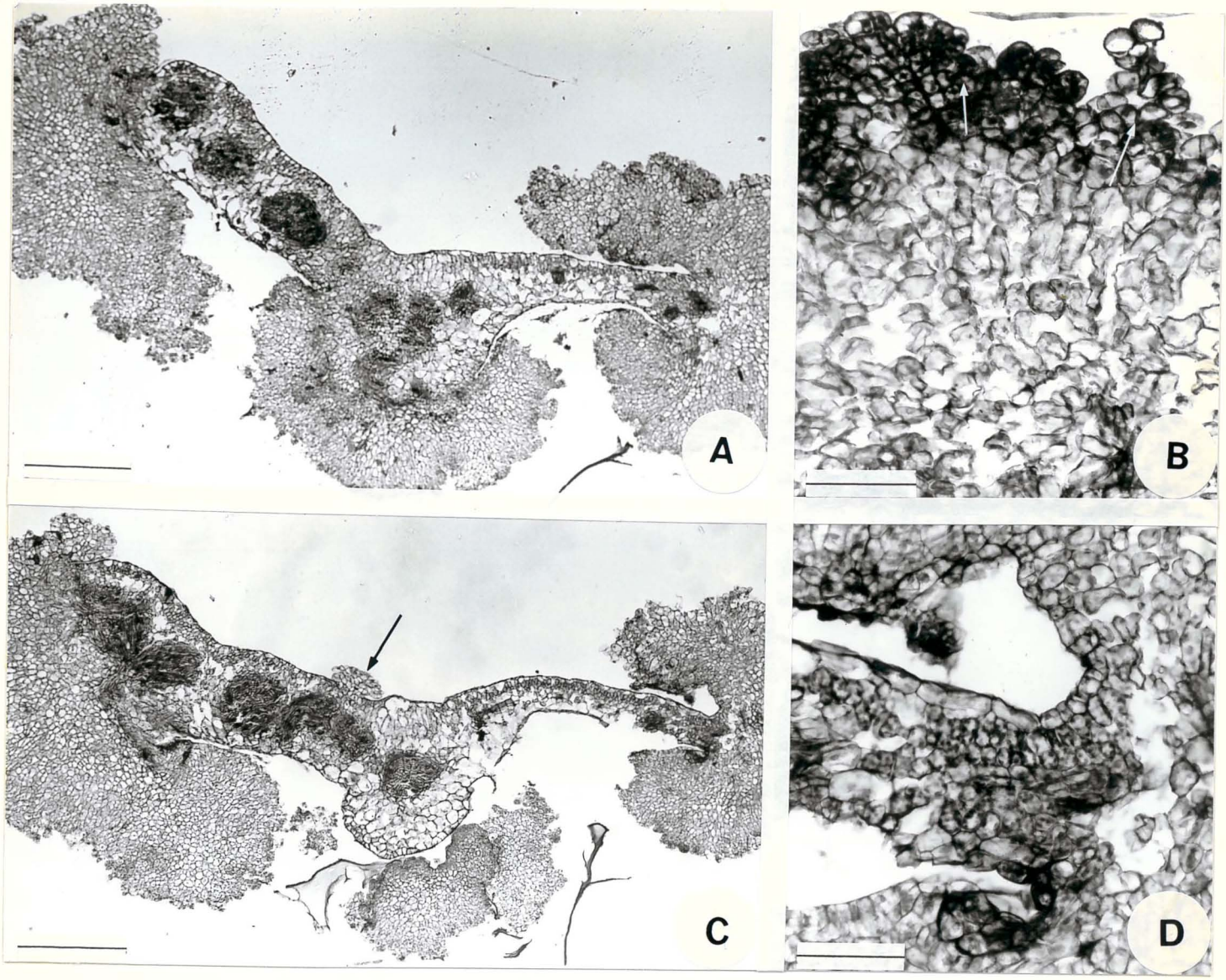
Figura 16. Cortes longitudinais dos explantes foliares com 7 dias de cultura *in vitro*.



(A e C) presença de primórdio de gemas ou meristemóides (setas) na grande massa de células meristemáticas; (B e D) detalhe em maior aumento dos primórdios de gema.

As barras da Figura 17 (A, B, C e D) correspondem respectivamente a 200, 200, 100 e 100 μm.

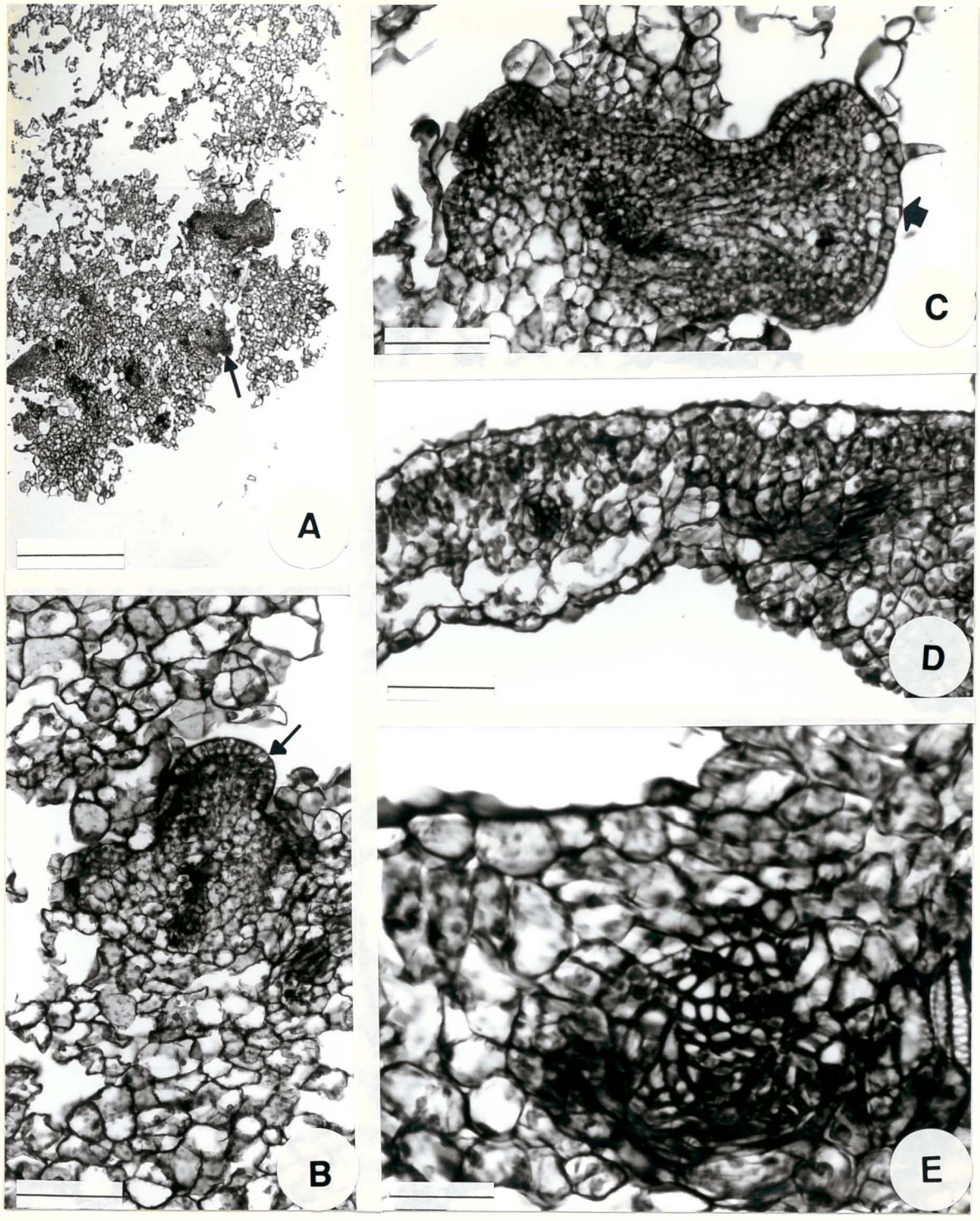
Figura 17. Cortes longitudinais de calos com 10 dias de cultura *in vitro*.



(A) na porção mais periférica ao ferimento do explante observa-se a ocorrência de calos nas extremidades e na região da nervura central; (B) a periferia destes calos apresentam células meristemáticas agrupadas para formar meristemóides (setas); (C) a porção mais central do explante (distante do ferimento) apresenta indução de calo, mas não na região da nervura central embora esta e as nervuras laterais se apresentem completamente alteradas; a seta mostra formação de calo na porção oposta ao meio de cultura, provavelmente em local ferido no momento da inoculação; (D) detalhe em maior aumento da região de transição entre o calo e o explante.

As barras da Figura 18 (A, B, C e D) correspondem respectivamente a 500, 100, 500 e 100 μm.

Figura 18. Cortes transversais de calos com 25 dias de cultura *in vitro*.



(A) na porção mais periférica do calo observa-se gemas caulinares (setas); (B e C) detalhe em maior aumento de gemas caulinares; (C) tricoma já diferenciado; (D) parênquimas esponjoso e paliçadico em profunda transformação nas proximidades da região de formação do calo; (E) detalhe em maior aumento da nervura lateral grandemente alterada (seta).

As barras da Figura 19 (A, B, C, D e E) correspondem respectivamente a 500, 100, 100, 100 e 50 μm.

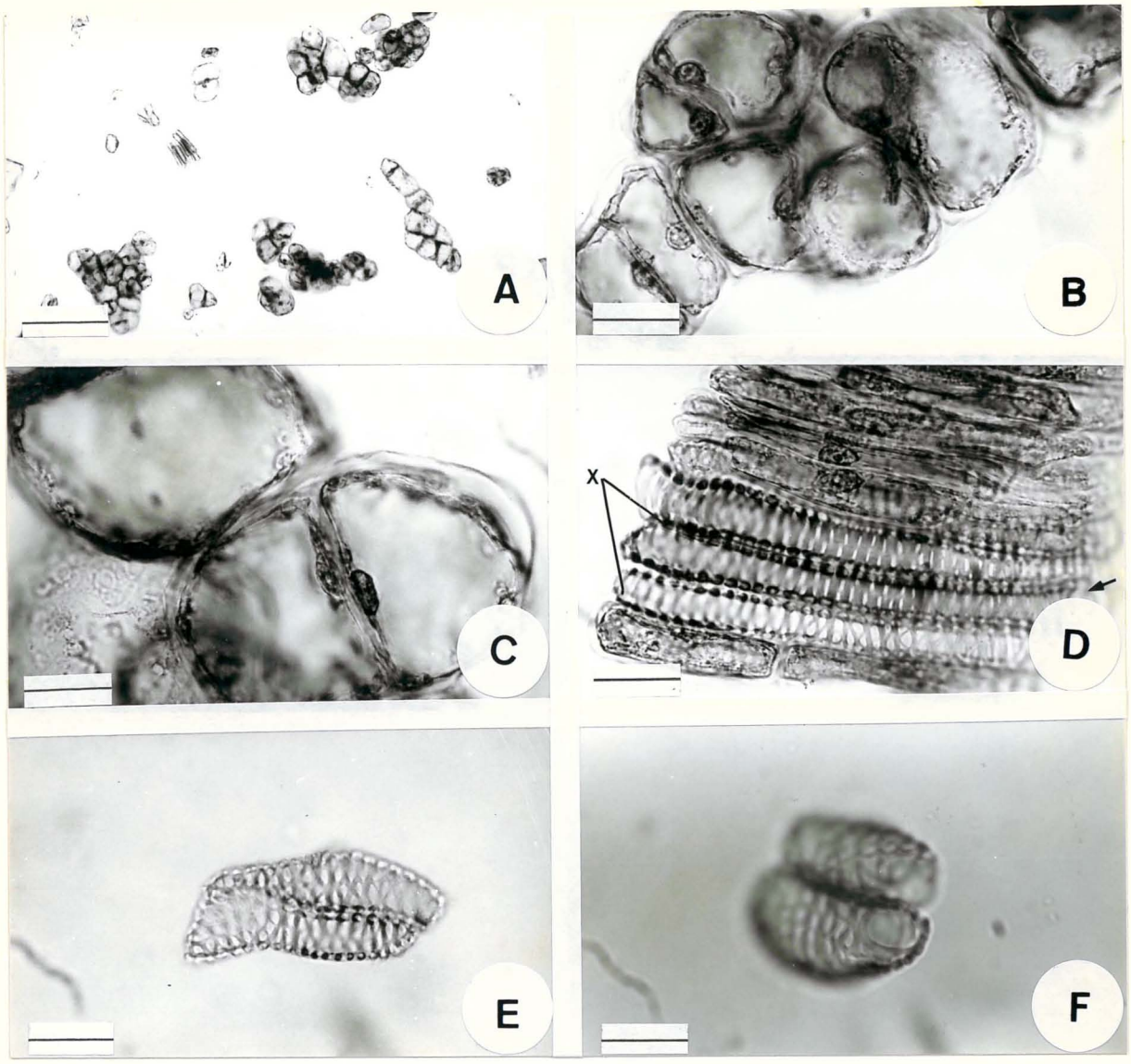
Figura 19. Cortes transversais de calos com 30 dias de cultura *in vitro*.

Verifica-se que várias gemas diferenciaram-se na região periférica do calo (19A, 19B e 19C). No restante do explante, correspondente a região mais afastada do ferimento não houve indução de calo mesmo no período de 30 dias de cultura; no entanto, os parênquimas paliçadico e esponjoso, próximos ao calo, mostram-se profundamente alterados (19D), assim como os feixes laterais, os quais apresentam mais número de elementos traqueais (19E).

A Figura 20 apresenta uma caracterização geral dos calos induzidos em explantes foliares após 30 dias de cultura em relação a células parenquimáticas e aos elementos de condução. Em (20A) é mostrado o aspecto geral dos diversos elementos celulares do calo dissociado; em (20B e 20C) é mostrado a variabilidade de tamanho encontrada na população de células parenquimáticas do calo (fotos na mesma escala); elementos de vaso são mostrados em 20D e 20F (seta em D mostra placa de perfuração) e traqueíde com espessamento reticulado em (20E).

Assim, no material em estudo, o processo de indução de calos inicia-se com as divisões ocorridas nas células do parênquima vascular, principalmente floema e da bainha do feixe, no 2º dia de cultura muito antes das evidências externas. O processo de indução só é observado macroscópicamente por volta do 5º dia. A diferenciação de partes aéreas neste calo induzido, tem início por volta do 10º dia de cultura, com a formação de primórdios de gemas ou meristemóides; do 20º ao 25º dia de cultura ocorre a

diferenciação das gemas a partir dos primórdios, nas porções mais externas do calo. São os chamados "pontos de regeneração". A partir desse momento as gemas passam a se desenvolver, tornando-se bem evidentes por volta do 30º dia de cultura. O processo de regeneração em *S. guianensis* se dá portanto, via organogênese de partes aéreas.



(A) aspecto geral dos elementos celulares do calo dissociado; (B e C) células parenquimáticas apresentando variabilidade no tamanho; (B) núcleo é relativamente grande, o nucléolo evidente e o vacúolo bem desenvolvido; (C) o núcleo é menos evidente porém o vacúolo é bem desenvolvido; (D) elementos do vaso do xilema com espessamento reticulado (X), a seta indica placa de perfuração; (E) traqueides; (F) elementos de vaso mais curtos.

As barras da Figura 20 (A, B, C, D, E e F) correspondem respectivamente a 200, 20, 20, 20, 20, e 20 μm.

Figura 20. Aspectos estruturais do calo após 30 dias de cultivo *in vitro*.

5. CONCLUSÕES

1. O cultivo *in vitro* em meio basal MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com NAA e BAP de explantes foliares da cv IRI 1022 da espécie *S. guianensis*, promove as seguintes respostas morfogenéticas ao final de 30 dias: indução de rizogênese direta, naqueles meios suplementados com NAA isoladamente; indução de calos com crescimento muito reduzido e intensa organogênese de partes aéreas, naqueles meios suplementados com BAP isoladamente e, indução de calos com crescimento e frequência de regeneração das partes aéreas variáveis, naqueles meios suplementados com NAA e BAP conjuntamente;

2. Os calos primários induzidos em meios suplementados com concentrações de NAA superiores ao dobro em relação as de BAP e mantidos nas condições de 16 horas luz e temperatura entre 25 e 28°C tendem a ser grandes, compactos, com coloração clara e apresentar as menores frequências de regeneração de gemas e/ou brotos observadas; estas tendências se acentuam com o aumento nos valores da relação NAA/BAP e na presença de NAA sómente;

3. Os meios suplementados com NAA e BAP (na proporção 2:1, respectivamente) e na concentração de 2,0 mg/l de NAA promovem regeneração de gemas e/ou brotos em calos primários;

4. A presença de luz não é necessária para haver indução de calos, mas sim para a organogênese de partes aéreas;

5. Existe variação nas respostas ao cultivo *in vitro* na população de *Stylosanthes guianensis* avaliada, com fortes indícios de que o caráter regeneração seja de natureza herdável;

6. O potencial morfogenético dos calos derivados de explantes foliares da cv IRI 1022, mantém-se por períodos prolongados, superiores a um ano;

7. Plantas SC_1 (regenerantes primários) mostram variações quanto ao aspecto vegetativo e reprodutivo (dias para o florescimento e produção de sementes);

8. Os eventos chaves que levam a indução de calos em explantes foliares da cultivar IRI 1022, ocorrem entre o 2º e o 3º dias de cultura; as primeiras divisões celulares que levam o explante foliar a se desdiferenciar e a formar calos, ocorrem nas regiões de ferimento, principalmente a nível da nervura principal, em células do parênquima vascular e da bainha do feixe; as divisões prosseguem então, pelo tecido clorofiliano e epiderme, neste caso, particularmente na região em contato com o meio; em torno do 10º dia de

cultura, são observados os meristemóides, ou primórdio de gemas, estes se concentram nas regiões periféricas do calo;

9. A regeneração *in vitro* de plantas inteiras ocorreu a partir da organogênese de partes aéreas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, P.B. & BUFARAH, G. **Plantas forrageiras;** gramíneas e leguminosas. São Paulo, Nobel, 1982. 150p.

ALCÂNTARA, P.B.; MECELIS, N.R.; GHISI, O.M.A.A.; TULMANN NETO, A.; MENTEN, J.O.M.; ANDO, A. Induced mutations for disease resistance in *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. In: WORKSHOP ON THE IMPROVEMENT OF GRAIN LEGUME PRODUCTION USING INDUCED MUTATIONS, Pullman, 1988. **Proceedings**. Viena, IAEA, 1988. p.229-34.

ALTAF, N. & AHMAD, M.S. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Legumes and oil seed crops I**. Berlin, Springer-Verlag, 1990. p.100-13. (Biotecnology in Agriculture and Forestry, 10).

ARCIONI, S.; DAMIANI, F.; PEZZOTTI, I.; LUPOTTO, E. Alfafa, lucerne (*Medicago* spp.). In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Legumes and oil seed crops I.** Berlin, Springer-Verlag, 1990. p. 197-241. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 10).

ARCIONI, S.; DAMIANI, F.; PUPILLI, F.; PEZZOTTI, M. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in *Medicago sativa* L. **Journal of Genetics & Breeding**, Rome, **43**: 223-30, 1989.

ARCIONI, S.; DAVEY, M.R.; SANTOS, A.V.P. dos; COCKING, E.C. Somatic embryogenesis in tissues from mesophyll and cell suspension in tissues from mesophyl and cell suspension

protoplasts of *Medicago coerulea* and *M. glutinosa*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Jena, **106**: 105-10, 1982.

ATANASSOV, A. & BROWN, D.C.W. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 3: 149-62, 1984.

BARROS, L.M. Avaliação da variabilidade de caracteres agronômicos em populações de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) S.W. Piracicaba, 1978. 108p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

BARWALE, U.B. & WIDHOLM, J.M. Soybean: plant regeneration and somaclonal variation. In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Legumes and oil seed crops I**. Berlin, Springer-Verlag, 1990. p.114-33. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 10).

BATTISTIN, A. & MARTINS, P.S. Variability in morphological characters of different taxons of the genus *Stylosanthes* Sw. (Leguminosae - Papilionoideae). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, **11**(1): 111-21, 1988.

BHOJWANI, S.S. & RAZDAN, M.K. In: _____. **Plant tissue culture**: theory and practice. Amsterdan, Elsevier, 1983. 502p. (Developments in Crop Science).

BHOJWANI, S.S. & WHITE, D.W.R. Mesophyll protoplasts of white clover: isolation, culture and organogenesis. **Plant Science Letters**, Amsterdam, **26**: 265-71, 1982.

BHOJWANI, S.S.; MULLINS, K.; COHEN, D. Intra-varietal variation for in vitro plant regeneration in the genus *Trifolium*. **Euphytica**, Wageningen, **33**: 915-21, 1984.

BINGHAM, E.T.; HURLEY, L.V.; KAATZ, D.M.; SAUNDERS, J.W. Breeding alfafa which regenerates from callus tissue in culture. **Crop Science**, Madison, **15**: 719-21, 1975.

BORNMAN, C.H.; ABBOTT, J.G.; NOEL, A.R.A.; SNIJMAN, D.A. *Nicotiana tabacum* callus studies. IV. Anatomy and differentiation of vascular tissue. **Zeitschrift für Pflanzenphysiology**, Jena, **82**: 396-406, 1977.

BROWN, D.C.W. & ATANASSOV, A. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **4**: 111-22, 1985.

BROWN, D.C.W. & THORPE, T.A. Plant regeneration by organogenesis. In: VASIL, I.K., ed. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York, Academic Press, 1986. v.3. Plant Regeneration and Genetic Variability, p.49-65.

BROWN, D.C.W.; NAGARAJAN, P.; WALTON, P.D. Embryogenic *in vitro* responses in creeping and non creeping rooted selection from *Medicago media* L. **Journal of Genetics & Breeding**, Rome, **43**: 73-6, 1989.

BURGESS, J. **An introduction to plant cell development**. Cambridge, Cambridge University Press, 1989. 246p.

CAMERON, D.F.; HUTTON, E.M.; MILES, J.W.; BROLMANN, J.B. Plant breeding in *Stylosanthes*. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney, Academic Press, 1984. p.589-605.

CHEN, T.H.H.; MOROWITCH, J.; THOMPSON, B.G. Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of alfafa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **8**: 73-81, 1987.

CHLYAH, H. Inter-tissue correlations in organ fragments - organogenetic capacity of tissues excised from stem segments of *Torenia fournieri* und cultured separately *in vitro*. **Plant Physiology**, Bethesda, **54**: 341-8, 1974.

COSTA, N.M.S. & FERREIRA, M.B. Some brazilian species of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney, Academic Press, 1984. p.23-48.

CROOKSTON, R.K.; TREHARNE, K.J.; LUDFORD, P.; OZBUN, J.L. Response of beans to shading. **Crop Science**, Madison, **15**: 412-6, 1975.

D'AMATO, F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, **3**: 73-112, 1985.

DAMIANI, E.; PEZZOTTI, M.; ARCIONI, S. Somaclonal variation in *Lotus corniculatus* L. in relation to plant breeding purposes. **Euphytica**, Wageningen, **46**: 35-41, 1990.

DAVIS, R.D.; IRWIN, J.A.G.; CAMERON, D.F.; SHEPHERD, R.K. Epidemiological studies on the anthracnose diseases of *Stylosanthes* spp. caused by *Colletotrichum gloesporioides* in North Queensland and pathogenic specialization within the natural fungal population. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, **38**: 1019-32, 1987.

D'ASSUMPÇÃO, W.R.C. O gênero *Stylosanthes* em Minas Gerais (Anatomia). **Oréades**, Belo Horizonte, **5**: 97-115, 1978.

DIJAK, M. & BROWN, D.C.W. Patterns of direct and indirect embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **9**: 121-30, 1987.

DIXON, R.A. **Plant cell culture, a practical approach.** Oxford, IRL Press, 1985. 236p.

DODDS, J.H. & ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture.** Cambridge, Cambridge University Press, 1985. 232p.

EAPEN, S. & GILL, R. Regeneration of plants from cultured root explants of mothbean (*Vigna aconitifolia* J. Jacq. Marechal). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, 72: 384-7, 1986.

EDYE, L.A. & CAMERON, D.G. Prospects for *Stylosanthes* improvement and utilization. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. **The biology and agronomic of *Stylosanthes*.** Sydney, Academic Press, 1984. p.571-87.

EDYE, L.A.; GROF, B.; WALKER, B. Agronomic variation and potential utilization of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. **The biology and agronomy of *Stylosanthes*.** Sydney, Academic Press, 1984. p.547-70.

EVANS, D.A. Somaclonal variation-genetic basis and breeding applications. **Trends in Genetics**, Cambridge, 5(2): 46-50, 1989.

EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. **Handbook of plant cell culture**; techniques for propagation and breeding. New York, McMillan, 1983. v.1, 970p.

FERREIRA, M.B. & COSTA, N.M.S. **O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil.** Belo Horizonte, EPAMIG, 1979. 107p.

FUKUDA, H. & KOMAMINE, A. Cytodifferentiation. In: VASIL, I.K., ed. **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** New York, Academic Press, 1985. p.149-212.

GIFFORD Jr, E.M. & DENGLER, P.E. Histones and alkaline fast green staining of onion roots. **American Journal of Botany,** New York, 53: 1125-32, 1966.

GODWIN, I.D.; GORDON, G.H.; CAMERON, D.F. Callus culture - derived somaclonal variation in the tropical pasture legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. **Plant Breeding,** Berlin, 98: 220-7, 1987a.

GODWIN, I.D.; GORDON, G.H.; CAMERON, D.F. Plant regeneration from leaf-derived callus cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes scabra* Vog. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** Dordrecht, 9: 3-8, 1987b.

HACCIUS, B. Question of unicelular origin of non zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology,** New Delhi, 28: 74-81, 1978.

HALPERIN, W. Attainment and retention of morphogenetic capacity in vitro. In: VASIL, I.K., ed. **Cell culture and somatic genetics of plants.** New York, Academic Press, 1986. v.3. Plant Regeneration and Genetic Variability, p.3-47.

HAMMATT, N.; GHOSE, T.K.; DAVEY, M.R. Regeneration in legumes. In: VASIL, I.K., ed. **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** New York, Academic Press, 1986. v.3. Plant Regeneration and Genetic Variability, p.67-95.

HUXTER, T.J.; REID, D.M.; THORPE, T.A. Ethylene production by tobacco (*Nicotiana tabacum*) callus. **Physiologia Plantarum,** Kobenhavin, 46: 374-80, 1979.

HUXTER, T.J.; THORPE, T.A.; REID, D.M. Shoot initiation in light and dark grown tobacco callus: the role of ethylene. **Physiologia Plantarum,** Kobenhavin, 53: 319-26, 1981.

HUYGHE, C. Les cultures *in vitro* chez les legumineuses à grosses graines. **Agronomie**, Paris, **10**: 29-49, 1990.

HYMOWITZ, T.; STEENMEIJER, H.P.; CARDOSO, A.; NUTI, P. Informações iniciais sobre *Stylosanthes gracilis* - IRI 1022 - alfafa do Nordeste. **Zootecnia**, São Paulo, **5**: 39-41, 1967.

IRWIN, J.A.G. & CAMERON, D.F. Two diseases in *Stylosanthes* spp. caused by *Colletotrichum gloeosporioides* inAutralia, and pathogenic specialization within one of causal organisms. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, **29**: 305-17, 1978.

IRWIN, J.A.G.; TREVORROW, P.R.; CAMERON, D.F. Histopathology of compatible interactions involving biotypes of *Colletotrichum gloeosporioides* thatcause anthracnose of *Stylosanthes* spp. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, **32**: 631-40, 1984.

ISON, R.L. & HUMPHREYS, L.R. Reproductive physiology of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. **The biology and agronomy of stylosanthes**. Sydney, Academic Press, 1984. p.257-77.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York, MacGraw-Hill, 1940. 523p.

KERBAUY, G.B.; MONTEIRO, W.R.; KRAUS, J.E.; HELL, K.G. Some physiological and structural aspects of citokinin-autonomy in the callus of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, **132**: 218-22, 1988.

KEYES, G.J.; COLLINS, G.B.; TAYLOR, N.L. Genetic variation in tissue cultures of red clover. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, **58**: 265-71, 1980.

KIRKBRIDE, J.H. & KIRKBRIDE, M.C.G. Typification of *Stylosanthes* (leguminosae) and its sections. **Taxon,** Berlin, **36**(2): 455-8, 1987.

KRAUS, J.,E.; MONTEIRO, W.R.; KERBAUY, G.B. Calos de tabaco autônomos e dependentes de citocinina comparados em seus aspectos morfológicos. **Revista Brasileira de Botânica,** São Paulo, **8**: 191-7, 1985.

LARK, K.G. The molecular and somatic genetics of soybean an inbreeding plant. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., Buenos Aires, 1989. **Proceedings**. Buenos Aires, Asociacion Argentina de la Soja, 1989. v.3, p.1252-6.

LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, **60**: 197-214, 1981.

LEE, M. & PHILLIPS, R.L. The chromosomal basis of somaclonal variation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Stanford, **39**: 413-37, 1988.

LITTLE, D.A.; McIVOR, J.G.; McLEAN, R.W. The chemical composition and nutritive value of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney, Academic Press, 1984. p.381-403.

LUPOTTO, E. Propagation of an embryogenic culture of *Medicago sativa* L. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Jena, **111**: 95-104, 1983.

MANNERS, J.M. Transformation of *Stylosanthes* spp. using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, New York, **6**: 204-7, 1987.

MANNERS, J.M. Transgenic plants of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. **Plant Science**, Amsterdam, **55**: 61-8, 1988.

MANNERS, J.M. & WAY, H. Efficient transformation with regeneration of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis* using *Agrobacterium rhizogenes* and Ti plasmid - binary vector system. **Plant Cell Reports**, New York, **8**: 341-5, 1989.

MARIOTTI, D.; PEZZOTTI, M.; FALISTOCCO, E.; ARCIONI, S. Plant regeneration from leaf - derived callus of *Lotus corniculatus* L. cv. Franco. **Genética Agrária**, Rome, **38**: 219-32, 1984.

MEIJER, E.G.M. High-frequency plant regeneration from hypocotyl and leaf-derived tissue cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavin, **56**: 381-5, 1982.

MEIJER, E.G.M. Some aspects of long-term tissue culture of *Stylosanthes guyanensis* (Aubl.) Sw. (Leguminosae). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, **117**: 131-5, 1984.

MEIJER, E.G.M. & BROUGHTON, W.J. Regeneration of whole plants from hypocotyl, root and leaf-derived tissue cultures of the pasture legume *Stylosanthes guyanensis*. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavin, **52**: 280-4, 1981.

MEIJER, E.G.M. & STEINBISS, H.H. Plantlet regeneration from suspension and protoplast cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) (Sw.). **Annals of Botany**, Oxford, **52**: 305-10, 1983.

MEIJER, E.G.M. & SZABADOS, L. Cell and tissue culture of *Stylosanthes* spp. In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Legumes and oil**

seed crops I. Berlin, Springer-Verlag, 1990. p.242-87. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 10).

MILES, J.W. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of outcrossing rate in *Stylosanthes guianensis*. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, 36: 259-65, 1985.

MILES, J.W.; ROCA, W.M.; TABARES, E. Assessment of somaclonal variation in *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GENETIC MANIPULATION IN CROPS, 2., El-Batan, 1988. **Review of advances in plant biotechnology**; 1985-88. México, CIMMYT; Manila, IRRI, 1989. p.249-57.

MITTEN, D.H.; SATO, S.J.; SKOKUT, T.A. *In vitro* regenerative potential of alfafa germplasm sources. **Crop Science**, Madison, **24**: 943-5, 1984.

MOHLENBROCK, J. A revision of the genus *Stylosanthes*. **Annals of Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, **44**: 299-354, 1958.

MONACELLI, B.; ALTAMURA, M.M.; PASQUA, G.; BIASINE, M.G.; SALA, F. The histogenesis of somaclones from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cotyledons. **Protoplasma**, Leipzig, **142**: 156-63, 1988.

MORRISH, F.; VASIL, V.; VASIL, I.K. Developmental morphogenesis and genetic manipulation in tissue and cell culture of Gramineae. **Advances in Genetics**, New York, **24**: 431-99, 1987.

MROGINSKI, L.A. & KARTHA, K.K. Regeneration of plants from callus tissue of the forage legume *Stylosanthes guianensis*. **Plant Science Letters**, Amsterdam, **23**: 245-51, 1981.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, **25**: 135-66, 1974.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavin, **15**: 473-97, 1962.

NAGARAJAN, P.; McKENZIE, J.S.; WALTON, P.D. Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago* spp. in tissue culture. **Plant Cell Reports**, New York, 5: 77-80, 1986.

NEGRILLO, B.G. **Um modelo linear geral não paramétrico.** Campinas, UNICAMP, 1987. 7p. (Relatório Técnico, 34).

NOVAK, F.J. & KONECNA, D. Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of alfafa (*Medicago sativa* L.). **Zeitschrift für Pflanzenphysiology**, Jena, **105**: 279-84, 1982.

OELCK, M.M. & SCHIEDER, O. Genotypic differences in some legume species affecting the redifferentiation ability from callus to plants. **Zeitschrift für Pflanzenzúnchtg**, Berlin, **91**: 312-21, 1983.

ORR, W.; SINGH, J.; BROWN, D.C.W. Induction of freezing tolerance in alfafa cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, New York, **4**: 15-8, 1985.

PARROT, W.A. & COLLINS, G.B. Callus and shoot-tip culture of eight *Trifolium* species *in vitro* with regeneration via somatic embryogenesis of *T. rubens*. **Plant Science Letters**, Amsterdam, **28**: 189-94, 1982/83.

PATEL, K. & THORPE, T. Histochemical examination of shoot initiation in cultured cotyledon explants of radiata pine. **Botanical Gazette**, Chicago, **145**(3): 312-22, 1984.

PEREIRA-NETO, A.B. de; FERREIRA, M.E.; CARNEIRO VIEIRA, M.L.; GRATTAPAGLIA, D. Efeito da interação intensidade de radiação luminosa x combinação de AIA e BAP sobre a diferenciação de explantes foliares de *Stylosanthes guianensis*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2, Brasília, 1987. **Resumos.** Brasília, EMBRAPA - CNPH. 1987. p.22.

PHAN, C.T. Vitreous state in vitro culture: ethylene versus cytokinin. **Plant Cell Reports**, New York, **9**: 517-9, 1991.

PHILLIPS, G.C. & COLLINS, G.B. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. **Crop Science**, Madison, **19**: 59-64, 1979.

PHILLIPS, G.C. & COLLINS, G.B. Red clover and other forage legumes. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. **Handbook of plant cell culture.** New York, Macmillan, 1984. v.2. Crop Species, p.137-68.

PHILLIPS, G.C.; COLLINS, G.B.; TAYLOR, N.L. Interspecific hybridization of red clover (*Trifolium pratense* L.) with *T. sarosiense* Hazsl. using *in vitro* embryo rescue. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, **62**: 17-24, 1982.

REISCH, B. & BINGHAM, E.T. The genetic control of bud formation from calus cultures of diploid alfafa. **Plant Science Letters**, Amsterdam, **20**: 71-7, 1980.

REY, H.Y.; BOVO, O.A.; MROGINSKI, L.A. Cultivo *in vitro* de tejidos de tres espécies de **Stylosanthes** (Leguminosae). **Agronomie**, Paris, **5**: 819-24, 1985.

ROSS, M.K.; THORPE, T.A.; COSTERTON, J.W. Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures.

American Journal of Botany, New York, 60(8): 788-95, 1973.

RUDD, V.E. Tribe 14. Aeschynomeneae (Benth.) Hutch (1964). In: POLHILL, R.M. & RAVEN, P.H., ed. **Advances in legume systematics.** Kew, Royal Botanic Gardens,1981. p.347-54.

SASS, J.E. **Botanical microtechnique.** Iowa, The Iowa State College Press, 1951. 228p.

SATOR, C. Studies on shoot regeneration of lupins (*Lupinus* spp.). **Plant Cell Reports,** New York, 4: 126-8, 1985.

SATOR, C. Lupins (*Lupinus* spp.). In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Legumes and soil seed crops I.** Berlin,Springer-Verlag, 1990a. p.288-311. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 10).

SAUNDERS, J.W. & BINGHAM, E.T. Production of alfafa plants from callus tissue. **Crop Science,** Madison, 12: 804-8, 1972.

SAUNDERS, J.W. & BINGHAM, E.T. Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa.* **American Journal of Botany,** New York, 62: 850-5, 1975.

SCOWCROFT, W.R. & ADAMSON, J.A. Organogenesis from callus cultures of the legume *Stylosanthes hamata.* **Plant Science Letters,** Amsterdam, 7: 39-42, 1976.

STACE, H.M. & CAMERON, D.F. Cytogenetics and the evolution of *Stylosanthes.* In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. **The biology and agronomy of *Stylosanthes*.** Sydney, Academic Press, 1984. p.49-72.

SUGIYAMA, M. & KOMAMINE, A. Transdifferentiation of quiescent parenchymatous cells into tracheary elements. **Cell Differentiation and Development**, Amsterdam, **31**: 77-87, 1990.

SUTHERST, R.W.; WILSON, L.J.; REID, R.; KERR, J.D. A survey of the ability of tropical legumes in the genus *Stylosanthes* to trap larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Ixodidae). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, **2**: 473-9, 1988.

SWANSON, E.B.; SOMERS, D.A.; TOMES, D.T. Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Legumes and oil seed crops I**. Berlin, Springer-Verlag, 1990. p. 323-40. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 10).

SWANSON, E.B.; TOMES, D.T.; HOKPINS, W.G. Modifications to callus culture characteristics and plastid differentiation by the formation of an albino callus of *Lotus corniculatus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **61**: 2500-5, 1983.

SZABADOS, L. & ROCA, W.M. Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis*. A tropical forage legume. **Plant Cell Reports**, New York, **3**: 174-7, 1986.

THOMAS, D. Global ventures in *Stylosanthes* I. South America. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney, Academic Press, 1984. p. 451-66.

THORPE, T.A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. **International Review of Cytology**, New York, **11A**: 71-11, 1980.

THORPE, T.A. & MURASHIGE, T. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **48**: 277-85, 1970.

T'MANNETJE, L. A revision of the genus *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, **25**: 347-62, 1977.

T'MANNETJE, L. Considerations on the taxonomy of the genus *Stylosanthes*. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney, Academic Press, 1984. p.1-21.

TRAN THANH VAN, M.; DIEN, N.T.; CHLYAH, A. Regulation of organogenesis in small explants of superficial tissue of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, Berlin, **119**: 149-59, 1974.

TRONGKONGSIN, K. & HUMPHREYS, L.R. Simulated latitudinal effects on flowering and seed production of *Stylosanthes guianensis* selections. **Tropical Grasslands**, Brisbane, **21**(2): 64-71, 1987.

VIEIRA, M.L.C. Estudo citotaxonômico de espécies brasileiras do gênero *Stylosanthes* Sw. Piracicaba, 1988. 135p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

VIEIRA, M.L.C.; JONES, B.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R. Plant regeneration from protoplasts isolated from seedling cotyledons of *Stylosanthes guianensis*, *S.macrocephala* and *S. scabra*. **Plant Cell Reports**, New York, **9**: 289-92, 1990.

VILLALOBOS, V.M.; YEUNG, E.C.; THORPE, T. Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **63**: 2172-6, 1985.

WALKER, K.A.; WENDELN, M.L.; JAWORSKI, E.G. Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*. The temporal separation of induction processes from differentiation processes. **Plant Science Letters**, Amsterdam, **16**: 23-30, 1979.

WANG, T.L.; EVERETT, N.P.; GOULD, A.R.; STREET, H.E. Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cell III. The effects opf cytokinin. **Protoplasma**, Leipzig, **106**: 23-35, 1981.

WAREING, P.F. & PHILLIPS, I.D.J. **Growth and differentiation plants**. Oxford, Pergamon Press, 1981. 343p.

WEBB, K.J.; FAY, M.F.; DALE, P.J. An investigation of morphogenesis within the genus *Trifolium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **11**: 37-46, 1987.

WILLIAMS, E.G. & MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. **Annals of Botany**, Oxford, **57**: 443-62, 1986.

WILLIAMS, E.G.; COLLINS, G.B.; MYERS, J.R. Clovers (*Trifolium* spp.). In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Legumes and oil seed crops I**. Berlin, Springer-Verlag, 1990. p.242-87. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 10).

WILLIAMS, R.J.; REID, R.; SCHULTZE-KRAFT, R.; COSTA, N.M.S.; THOMAS, B.D. Natural distribution of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney, Academic Press, 1984. p.73-101.

YEOMAN, M.M. & FORCHE, E. Cell proliferation and growth in callus cultures. **International Review of Citology**, New York, **11A**: 1-24, 1980.