

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MORFOGENÉTICO DE  
*Pinus caribaea* MORELET var. *hondurensis* BARR. & GOLF.  
"in vitro"

CRISTINA VIEIRA DE ALMEIDA  
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

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: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Fevereiro - 1991

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

A447a Almeida, Cristina Vieira de  
Avaliação do comportamento morfogênético de Pinus  
caribaea Morelet var. hondurensis Barr. & Colf. Piracicaba, 1991.

74p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ  
Bibliografia.

1. Pinheiro - Calo - Histologia 2. Pinheiro - Com-  
portamento morfogênético 3. Pinheiro - Cultura de te-  
cido 4. Pinheiro - Propagação "in vitro" I. Escola Su-  
perior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 634.9751

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MORFOGENÉTICO DE  
*Pinus caribaea* Morelet Var. *hondurensis* Barr & Golf. "in vi-  
tro"

CRISTINA VIEIRA DE ALMEIDA

Aprovada em: 03/04/1991

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves ESALQ/USP

Prof. Dr. Luiz Antônio Rochelle ESALQ/USP

Prof. Dr. Murilo de Melo ESALQ/USP



Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves  
Orientador

Às minhas filhas

CAROLINA e LÍVIA

e a meu marido

MARCILIO,

D E D I C O .

A meus pais

DÉCIO e MARLEY

O F E R E Ç O .

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves por seu desempenho na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, um especial agradecimento, pela orientação no início de minha carreira.

Ao Prof. Marcílio de Almeida pela excepcional colaboração durante toda a realização desta pesquisa.

À Duratex Florestal pelo fornecimento do material vegetal utilizado neste trabalho.

Ao Depto. de Botânica - ESALQ/USP, pela utilização de seus laboratórios de Anatomia e Cultura de Tecidos.

Ao Phocus Studium, na pessoa do Sr. Fued Kraide Sobrinho, pelos serviços prestados, dedicação e amizade.

Ao amigo Renato Colletti Jr. por sua colaboração.

À amiga Lúcia H. Pavan Forti por seu incentivo e colaboração.

À todos que direta ou indiretamente, colaboraram na execução do presente trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	vi
SUMMARY .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	03
2.1. Descrição da espécie <i>Pinus caribaea</i> More- let var. <i>hondurensis</i> Barr. & Golf .....	03
2.2. Morfogênese .....	06
2.3. Citomorfogênese .....	10
2.3.1. Sítios e planos de divisão .....	12
2.4. Embriogênese .....	16
2.4.1. Aspectos da embriogênese somática ..	16
2.4.2. Embriogênese somática direta .....	20
2.4.3. Embriogênese somática indireta .....	23
2.5. Organogênese .....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	28
3.1. Local de realização do trabalho .....	28
3.2. Determinação da fonte de explante .....	28
3.2.1. Enxertia seriada e poda sucessiva ..	28
3.2.2. Características do explante .....	29
3.3. Protocolo de esterilização .....	29
3.4. Inoculação dos explantes .....	30
3.5. Estabelecimento da cultura .....	31
3.6. Fases experimentais .....	31
3.6.1. Experimento n° 1 .....	31
3.6.2. Experimento n° 2 .....	32
3.7. Avaliações .....	34

	Página
3.7.1. Citológicas .....	34
3.7.2. Anátomo-histológica .....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
4.1. Experimento n° 1 .....	42
4.2. Experimento n° 2 .....	63
5. CONCLUSÕES .....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MORFOGENÉTICO DE  
*Pinus caribaeae* Morelet var. *hondurensis* Barr. & Golf.  
"in vitro"

Autora: Cristina Vieira de Almeida

Orientador: Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

## RESUMO

Os principais objetivos deste trabalho foram:

a) determinação do meio de cultura adequado para a obtenção de gemas adventícias; b) indução de caulogênese e embriogênese somática; c) avaliação anátomo-histológica a partir de explantes de gemas de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. & Golf. "in vitro".

Gemas axilares obtidas de 3a. poda sucessiva de 2a. enxertia seriada, foram utilizadas como explantes. Foram cultivados em meio de cultura de MURASHIGE & SKOOG (1964) e EEUWENS (1976), complementados com as vitaminas de MOREL & WETMORE (1951). Foram feitas modificações qualitativas dos reguladores de crescimento.

A análise dos resultados permitiram as seguintes conclusões: 1. a seqüência de transferências: 1/2 MS para MS + ANA + BA + vitaminas de Morel + 40g de sacarose

para o meio de cultura de Eeuwens foi necessária e fundamental para a indução de caulogênese; 2. a caulogênese em *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. & Golf., mostrou-se viável, 3. a organogênese indireta apresentou alta capacidade de multiplicação de gemas adventícias e de gemas axilares; 4. a embriogênese somática indireta foi possível, uma vez obtido calos com células embriônicas, agregados e embriões; 5. calos de coloração clara ou branco gelatinoso e friáveis, são fortes indicadores de morfogênese; 6. análise anátomo-histológica mostrou-se essencial por oferecer informações do comportamento das células.

EVALUATION OF THE MORPHOGENETIC BEHAVIOR OF  
*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. & Golf.  
"in vitro"

Author: Cristina Vieira de Almeida

Adviser: Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves

## SUMMARY

The objectives of this work were: a) determination of adequate tissue culture media for adventitious bud production; b) caulogenesis and somatic embryogenesis induction and c) anatomic-histologic evaluation from shoot explants of *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* in vitro.

Shoots collected from third successive hedging of second serial grafting trees were used as explants and cultivated in MURASHIGE & SKOOG (1962) and EEUWENS (1976) media, supplemented with MOREL & WETMORE (1951) vitamins. Quali quantitative modifications were made on the growth regulators rise.

The analysis of the results allowed to draw the following conclusions: 1. the sequences of transfers: 1/2 MS to MS + ANA + BA + Morel vitamins + 40 g/l sucrose to Eeuwens was necessary and fundamental to induce caulogenesis, 2. the caulogenesis in *Pinus caribaea* Morelet var.

*hondurensis* showed to be viable, 3. the indirect organogenesis shows high capacity for adventitious bud and axillary bud production, 4. the indirect somatic embryogenesis was possible since embryogenic callus was produced, 5. light or white gelatinous and friable calli are strong indicators of morphogenesis, 6. the anatomic-histologic analysis showed to be essential by giving information on cell behavior.

## 1. INTRODUÇÃO

Os objetivos dos trabalhos com árvores utilizando-se a cultura de células e tecidos como alternativa para a propagá-las são: otimizar os sistemas de produção de mudas ou clones, manutenção e/ou aumento da produtividade e outras fases de programa de melhoramento florestal.

Um dos processos de micropropagação envolve o desenvolvimento de clones a partir de gemas que são induzidas sob condições de laboratório (*in vitro*). Na estratégia de multiplicação de gemas axilares é importante que as gemas da base das folhas axilares sejam constantemente retiradas, para que novas gemas axilares possam se desenvolver e crescer.

A técnica *in vitro* é uma maneira ímpar de se estudar os eventos morfogenéticos, pois esta metodologia permite expor de forma experimental, os explantes às várias combinações quali-quantitativas dos reguladores de crescimento e condições ambientais.

Quando se estuda morfogênese *in vitro*, faz-se necessário a utilização de explantes que respondam ao estímulo (CHRISTIANSON & WARNICK, 1983). Após um período apropriado de indução, as células do explante tornam-se determinadas, através de um modelo específico de diferenciação.

A capacidade de um explante de formar ramos (caulogênese), pode ser determinada pela observação de sua resposta na proliferação de ramos em meio de cultura livre de estímulo, após terem sido induzidos por um breve período de tempo (CHRISTIANSON & WARNICK, 1983). Espera-se que a formação de calos possa ter uma importância nos estudos de controle do crescimento, podendo direcionar a formação de órgãos ou mesmo de plantas inteiras, a partir de espécies de valor comercial que apresentam dificuldades para a propagação vegetativa (DURZAN & CAMPBELL, 1974; DURZAN *et alii*, 1973).

Uma vez que se tenha optado pela metodologia de cultura *in vitro*, o presente trabalho teve como objetivos:

- A. Determinar meios de cultura mais adequados para a obtenção de gemas adventícias;
- B. Induzir caulogênese direta e/ou indireta;
- C. Avaliar histomorfologicamente os resultados obtidos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Descrição da espécie *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. & Golf

No Brasil, o *Pinus caribaea* Morelet pode ser considerada uma das espécies mais importantes, a partir da qual vem se desenvolvendo um extenso programa de melhoramento genético e atividade econômica (KAGEYAMA, 1980). Destaca-se nessa espécie a boa qualidade da madeira, para a produção de polpa de celulose de fibra longa para papel, para a indústria de construção civil como caxilhos, batentes, portas, forros; indústria química (resina e derivados), além do uso para proteção do solo.

A família Pinaceae é a maior e mais importante da ordem Coniferae, abrangendo nove gêneros e duzentas e dez espécies, sendo o gênero *Pinus* o que mais se destaca nessa ordem, abrangendo muitas espécies, amplamente distribuídas pelo Hemisfério Norte até os países tropicais e subtropicais nas Índias Ocidentais, Arquipélago das Fili-

pinas, Antilhas, Ilhas Bahamas, México, Guatemala, Honduras, Nicarágua, com maior ocorrência nos climas temperados, mas sem ultrapassar o Equador.

O gênero *Pinus* compreende noventa espécies agrupadas de acordo com as características organográficas. Pilger, citado por VIDAL (1962), divide o gênero *Pinus* nos seguintes subgêneros: *Haploxylon*, com os pinhos brancos, não resinosos e folhas penta-fasciculadas; e *Diploxylon*, que abrange os pinhos produtores de madeira mais clara, colorida, resinosa, com duas folhas na haste foliar.

Dentre as espécies do subgênero *Diploxylon*, se encontra o *Pinus caribaea* Morelet, que segundo LAMB (1973), ocorrem conjuntamente em populações naturais com *Pinus elliottii* (no sul da Flórida), *Pinus occidentalis*, *Pinus cubensis* e *Pinus tropicalis* (no oeste de Cuba), recebendo nomes locais como *Pinus caribaea* (inglês), pitch pine, pino de la Costa, pino colorado, ocote blanco, pino caribaea de Honduras e pino macho.

Segundo LAMB (1973), o *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. et. Golf. apresenta folhas aciculares, abertas nas extremidades dos ramos (em cachos) e persistentes por dois anos. As mesmas são dispostas em fascículos de três e algumas vezes quatro e cinco, com quinze e vinte e cinco centímetros de comprimento, secção triangular, com 1,5 mm de largura ou menos, serreada, rígidas, de cor verde escura e amarelecida, ligeiramente

brilhante com estômatos em linha e em toda a sua superfície, de dois a oito canais resiníferos, internos e raramente de apenas um mediano. Apresenta hipodermes biformes, espesso com três a cinco camadas de células, bainha de dez a doze milímetros de largura, marron clara, tornando-se escura e persistente.

As flores são estrobiformes, alojando-se as femininas em maior percentagem na parte superior da copa, enquanto as masculinas se concentram em maior quantidade na parte basal da mesma, sendo portanto espécie monóica. A polinização é predominantemente alógama e anemófila.

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

As sementes são ovóides, triangulares mais largas em uma das extremidades, pontiagudas em ambos os extremos, ligeiramente grossas e coloridas, com asas articuladas, membranosas e de fácil remoção mecânica. Internamente, protegendo o embrião encontra-se o tecido nutritivo do gametófilo feminino e o tecido externo ou integumento como a capa protetora da semente.

Nesta variedade acima descrita, destaca-se o número de cotilédones que varia entre 5 e 9, sendo mais comum 7 e 8. O hipocótilo, entretanto, é frequentemente de

cor avermelhada, causada pela presença da antocianina malvidina, que esporadicamente aparece nos cotilédones. Após 15 dias da germinação os cotilédones atingem seu tamanho máximo e acima deles logo aparece um feixe de folhas primárias, que assume a função de folhagem.

As folhas secundárias normalmente denominadas de acículas podem aparecer ocasionalmente no final da primeira estação de crescimento, mas em geral, acontece durante o segundo ano. As folhas primárias são sempre irregulares na sua aparência em relação às secundárias, e após 2 ou 3 anos, as folhas primárias são completamente substituídas pelas secundárias.

Os representantes arbóreos, quando adultos, alcançam até 45 m de altura, tronco normalmente reto, que pode chegar a 1,35 m de diâmetro à altura do peito. Os ramos são retos e ascendentes, formando normalmente uma capa densa e estreita. A casca nas árvores jovens é delgada, rugosa, sulcada e cor gris, e nas adultas se tornam fissuradas em placas achatadas, retangulares de cor escura esfoliativa.

## 2.2. Morfogênese

Morfogênese é definida como sendo alterações no crescimento e/ou no desenvolvimento, produzindo mudanças

estruturais na célula ou no tecido, capazes de originar embriões somáticos (embriogênese somática) ou órgãos adventícios (organogênese).

WARFING & PHILLIPS (1981), definem o termo crescimento como mudanças quantitativas que ocorrem durante o desenvolvimento, e também como as mudanças irreversíveis no tamanho de uma célula, órgão ou no organismo inteiro. Para o termo diferenciação, esses autores atribuem não só as alterações quantitativas no número e arranjo das células nos diferentes órgãos, mas também alterações qualitativas.

Segundo CROCOMO (1974), a diferenciação e o desenvolvimento consistem em que uma única célula, produza muitos tipos especializados de células, que finalmente formarão o organismo adulto. Esta exteriorização de estrutura e função está na realidade baseada na expressão e utilização da informação genética apropriadamente programada. Assim, a diferenciação está estreitamente ligada àquilo que na célula faz com que um gen particular seja ativo e proporcione a ação de uma enzima, ou aquilo que faz com que o outro gen seja inativo.

Certas células quanto mais diferenciadas, mais vagorosamente se dividem, sendo também uma constante a observação de que quanto menos diferenciadas, mais rapidamente sofrem divisão.

Tecidos com células diferenciadas colocados em meio de cultura, apresentam como primeira modificação o

aparecimento de um tipo especial de câmbio (câmbio de cicatrização), com produção de células bem menores que o tecido original. A estrutura e distribuição das organelas sugere maior atividade metabólica. Esta fase pode ser interpretada como uma dediferenciação, que é seguida por uma diferenciação, com um novo padrão de desenvolvimento: periderme, câmbio vascular ou meristemóide. Os meristemóides tornam-se centros de crescimento, que quando não se diferenciam, produzem grandes células parenquimatosas na periferia, formando tecido normalmente conhecido como calo. Nem todas as células do calo evoluem para células desse tipo, algumas podem se diferenciar em elementos de xilema e floema. Outras células, como as pequenas células meristemáticas dos centros de crescimento, permanecem indiferenciadas, com a aparência de um meristema apical. Estas estruturas podem produzir raízes (rizogênese) ou caules (caulogênese), com toda a variação de tipos celulares desses órgãos. Embriões também podem se desenvolver a partir dessas massas meristemáticas ou de células superficiais (embriogênese).

Células isoladas podem ser colocadas em cultura, suspensas em meio líquido. Geralmente são células diferenciadas, vacuolizadas (como as células do parênquima clorofiliano do mesófilo ou células isoladas de calos). Em culturas em suspensão, há grande variação de tamanho e forma das células, podendo então apresentarem-se esféricas, achatadas, gigantes multinucleadas, isodiamétricas ou

alongadas, com baixa ou alta relação nucleoplasmática (RNP). Esses tipos são característicos para a espécie, ou esta pode apresentar uma enorme variação dependente do meio de cultura.

O fundamental do problema da diferenciação é compreender como uma célula que se divide produz células filhas diferentes. Supõe-se que um dos fatores fundamentais na diferenciação é o estabelecimento da polaridade. É muito possível que as condições metabólicas em extremidades distintas de uma célula recém dividida possam ser diferentes, devido a uma distribuição desigual de organelas, estabelecendo-se a polaridade. Há casos entretanto, em que a polaridade parece preceder à divisão celular. É mesmo difícil distinguir quando a polaridade é um fator de diferenciação, ou quando é uma manifestação dessa diferenciação.

Além da polaridade, o meio é importante na diferenciação, podendo em certos casos, ser até um fator no estabelecimento desta. Uma célula na planta, está cercada de outras células, e esse ambiente faz com que as células se comportem de maneira característica, mantendo-se diferenciadas quando a diferenciação já foi estabelecida. Essas mesmas células diferenciadas, se isoladas e colocadas em cultura, podem se diferenciar novamente. As limitações à capacidade de diferenciar devem ser impostas pelo meio orgânico, especialmente pela colocação de uma célula em relação a outras células.

Para a compreensão da diferenciação celular deve-se levar em conta a existência de interações complexas entre o patrimônio genético contido em cada célula e as características estruturais e bioquímicas da planta como um todo. É evidente que, em cada caso específico, as características estruturais da célula podem refletir ou indicar a existência dessas interações.

Em se tratando de embriogênese zigótica, um dos mais importantes fatores no início da diferenciação é o estabelecimento da polaridade, especialmente no zigoto. Ela pode ser de certo modo controlada pelo meio no qual o zigoto se desenvolve. No zigoto de *Capsella bursa-pastoris* observa-se uma distribuição polarizada no citoplasma, o qual torna-se agregado no polo da chalaza, e um grande vacúolo se forma no polo micropilar. A primeira divisão transversal produz duas células, uma pequena, terminal, e uma grande basal.

### 2.3. Citomorfogênese

Nenhuma célula pode crescer, mudar de forma, assumir, manter ou alterar o estado de polaridade, diferenciar-se ou dividir sem um concomitante controle e ajuste de seu citoesqueleto. Todos estes eventos ocorrem em sequência durante a vida de uma célula individual, em tecidos

multicelulares e órgãos são coordenados de modo que a população de células desenvolva-se harmonicamente e produza uma definida organização global.

É um fenômeno geral na morfogênese de plantas que a formação da estrutura final seja o resultado da formação individual de cada célula, tendo sido originada pela inserção da parede celular em locais e planos específicos nas células pré-existentes. Isto não significa que a célula tenha independência completa, realmente a existência de um controle global que harmoniza e integra o formato dentro da população total de células, tem mesmo sido enfatizado pelo famoso provérbio de Bary "A planta faz as células, não as células a planta", confirmado pelas mais recentes revisões (GREEN, 1980). Isto não significa que as fases de divisão celular e o formato da célula estejam separados um do outro no tempo e no espaço. Eles, na verdade, estão relacionados em vários passos.

GUNNING (1981), observou na célula apical de *Azolla pinnata*, que a orientação da expansão celular está rigorosamente ligada à mitose, tanto que a célula recupera, aproximadamente, seu volume depois de cada divisão. A expansão que conduziu a divisão na célula apical, continua suavemente no jovem merofito, no início, sem futuras divisões e posteriormente acompanhada pela formação de tabiques (compartimentação celular) internos que reduzem a proporção do volume celular. O eixo de expansão altera-se

subtamente e *in loco*. As células se dividem em um plano transversal e as sucessivas mitoses no início, restauram o volume celular para uma padronização no tamanho em cada tipo de célula, mas eventualmente deixam possibilidades para a expansão sem divisão, embora toda fileira de células alongue na mesma extensão, a interrelação entre alongamento e o número de divisões transversais varie com o tipo de célula. Por exemplo, os elementos do xilema encerram sua expansão, no mínimo trinta e duas vezes mais longos que seus vizinhos, as células do periciclo.

A maioria dos órgãos de plantas, exibem uma variedade de interrelações entre divisão e expansão celular. Duas possibilidades extremas são a compartimentação (tabiques) interna sem crescimento, e a expansão do corpo da planta como um cenócito, sem nenhuma compartimentação interna preparatória. Além dessas observações, a raiz de *Azolla* ilustra como a regulação dos sítios e planos de divisão direcionam o cenário para um subsequente modelo de diferenciação celular e orientam processos de expansão no local em que produzem um órgão.

### 2.3.1. Sítios e planos de divisão

SINOTT & BLOCH (1941); VENVERLOO *et alii* (1980), registraram que em células vacuolizadas, a formação

de uma placa especialmente posicionada no citoplasma, os fragmossomos, antes dos núcleos entrarem em prófase, mostra que a célula antecipa seus futuros sítios e planos de divisão pelo estabelecimento de uma forma particular de citoesqueleto especialmente organizados. A coincidência entre a posição de um fragmossomo e a formação subsequente de um fragmoplasto, não é tão prontamente vista quando, como na maioria das células meristemáticas, o componente vacuolar é muito reduzido.

ÔTA (1961), centrifugou células de pêlos estaminais em divisão e concluiu que um modelo especialmente diferenciado é imprimido (antes da mitose) na região equatorial do córtex citoplasmático, e que em telófase, essa região é identificada e exerce uma força sobre as margens da placa da célula. Sabe-se, atualmente que em uma grande variedade de células o "modelo especialmente diferenciado" inclui um cinturão de microtúbulos que é formado antes da prófase e transitoriamente envolve a célula no córtex citoplasmático no sítio onde, em telófase tardia a beirada da placa da célula se fundiria com as paredes parentais.

PICKETT-HEAPS & NORTHCOTE (1966), chamaram esse cinturão de microtúbulos de banda de pré-prófase. A banda ocorre em raízes, ramos, folhas e pêlos em plantas floríferas e em vários órgãos de criptógamas. Esse fato não tem sido observado em cultura de suspensão de células ou calos.

BUSBY & GUNNING (1980), afirmaram que a presença da banda de pré-prófase prediz a linha de fusão da placa celular e paredes parentais quando presentes. Este é um prognóstico do fenômeno em que a banda desaparece na prófase, e usando as palavras de ÔTA, ainda em seu local fica como que "imprimido".

GUNNING *et alii* (1978), observaram que todas as divisões formativas e proliferativas são precedidas pelo desenvolvimento de uma banda de pré-prófase, seja ela anticlinal, periclinal transversal, simétrica ou assimétrica, sendo que a fidelidade dessa observação é extraordinária.

Acredita-se que haja uma combinação entre as instruções genéticas interna e sinais externos, onde os microtúbulos da banda de pré-prófase não possam fazer mais do que participar como uma ferramenta morfogenética na regulação dos sítios e planos de divisão (PICKETT-HEAPS & NORTHCOTE, 1966; PICKETT-HEAPS, 1974).

PACKARD & SATACK (1976); GALATIS & MITRAKOS (1979), GALATIS (1980), descreveram que o sítio cortical pode se tornar especializado ou talvez, estabilizado pela deposição de um conjunto particular de microfibrilas da parede sob a influência dos microtúbulos da banda da pré-prófase. Observaram ainda que pequenos espessamentos da parede ocorrem sobre a banda.

Um argumento alternativo, que talvez faça pouca justiça para a economia e eficiência com a qual as

células em geral parecem operar, condição em que os microtúbulos da banda de pré-prófase não tem um papel específico exceto como um reservatório de tubulina (PICKETT-HEAPS, 1974). Sob este ponto de vista, é sugerido que eles se formam onde são feitos, porque o sítio cortical tem, entre outras propriedades, um papel como o de um centro organizador de microtúbulos (HEPLER & PALEVITZ, 1974). Contudo, a orientação dos microtúbulos na banda de pré-prófase deu a impressão de estar sendo altamente controlada, tornando-se difícil de aceitar que eles são meros produtos.

Os microtúbulos não sintetizam celulose nem influenciam a quantidade de síntese (GRIMM *et alii*, 1976), o que eles oferecem é um sentido de controle espacial magestoso na formação da parede celular, ajudando desse modo a determinar a forma que será assumida pela expansão celular (MARCHANT, 1979).

Microtúbulos corticais são associados com o desenvolvimento localizado da parede celular em três níveis de organização. O primeiro é dentro da célula, como em elementos do xilema e poros do estômato. O segundo, diz respeito ao nível de desenvolvimento de toda a célula. Em células alongando, as fileiras transversais de microtúbulos predominantemente se estendem ao longo das paredes longitudinais, as quais possuem inicialmente microfibrilas transversais na parede. Para o terceiro nível de organização, há evidências de que a orientação dos microtúbulos é importante

tanto na iniciação dos órgãos, como nos seus subsequentes pontos de desenvolvimento global.

A produção de um órgão radialmente simétrico por um órgão parental, com polaridade ápico-basal, requer que certas células submetam-se a uma mudança de polaridade. Uma observação detalhada desse sistema (HARDHAM *et alii*, 1980), tem revelado que alterações morfológicas, são precedidas por mudanças na orientação dos microtúbulos, juntamente com mudanças em sua abundância.

A indicação de que mudanças cruciais no citoesqueleto, ocorram num estágio extremamente inicial, da sequência morfo genética global, são muito fortes. Elas ocorrem nas células da periferia do futuro meristema, o qual requer uma alteração da polaridade em sequência, para produzir a sua simetria radial.

## 2.4. Embriogênese

### 2.4.1. Aspectos da embriogênese somática

A embriogênese somática é um processo pelo qual as células somáticas desenvolvem plantas inteiras, passando por estágios sucessivos, característicos do desenvolvimento de embriões gaméticos. A técnica de obtenção de plantas por embriogênese somática, foi realizada pela

primeira vez utilizando-se de plantas de cenoura, onde os resultados obtidos foram satisfatórios. Em plantas superiores, a alta totipotencia, pode ser comprovada pelos trabalhos recentemente realizados com várias plantas perenes. Sendo, que a maioria delas são árvores, onde se destacam suas importâncias económicas para o homem, no que diz respeito a fonte de alimento, combustíveis, fibras e fármacos. Muitas dessas árvores, apresentam inflorescências grandes ou sementes que suportam desenvolvimento estável por vários meses. Aplicando-se a técnica de cultura *in vitro*, as características acima descritas, tornam-se extremamente úteis, por facilitar a manipulação com as diversas partes da planta, assim como: nucelo, óvulo e embriões imaturos, que são freqüentemente difíceis de se trabalhar.

O prolongado ciclo de vida das principais árvores com totipotencia confirmada, pode sofrer atraso na maturidade sexual. Em espécies cultivadas a partir de estruturas florais, o desempenho e a fidelidade das plantas obtidas via embriogênese somática, pode levar anos para ser avaliado. Em árvores de floresta, onde os períodos de rotação são tipicamente bem superiores à fase de maturidade sexual, podem levar décadas para se determinar a eficiência da embriogênese somática, como um método para a propagação de plantas.

Considera-se a diferença entre embriogênese zigótica e somática, o termo "embrióides" adotado por RAGHAVAN, 1986, que coloca a embriogênese somática de forma distinta dos embriões produzidos por fusão de gametas; portanto o termo embrião somático será usado para definir embriões produzidos a partir de cultura de células e tecidos.

O padrão embriogênico depende do estágio fisiológico do explante, que iniciará a obtenção de embriões, sendo que as características do explante, definirá um protocolo de cultura que será requerido para se concluir a embriogênese somática. Além desse fator, faz-se importante para o controle da morfogênese *in vitro*, a manipulação física, do hormônio e do ambiente do material vegetal.

Esse sistema de controle envolvem respectivamente: seleção de explante (resultados de enxertia, seguidas de podas seriadas, tamanho, idade e fenótipo); esterilização; meios de cultura (macro e microelementos químicos, carboidratos, bem como o controle da acidez da solução); a utilização de hormônios pré e pós-inoculação da planta e finalmente o controle ambiental, com o objetivo de dar às plantas *in vitro*, condições adequadas para o seu desenvolvimento, são fatores praticamente já definidos, para cada espécie vegetal.

O maior problema a ser destacado, principalmente em se tratando de espécies florestais, é exatamente a

fonte que fornecerá os clones, então designados de explantes.

O material vegetal utilizado como explante é restrito à tecidos que possam ser confiáveis na expressão de um genótipo conhecido. Infelizmente, até a presente data, a embriogênese em espécies florestais, pode somente ser obtida a partir de material embriônico.

SHARP *et alii* (1980, 1982), afirmam que o estágio de desenvolvimento do explante é crítico para o sucesso da embriogênese somática e sugerem, que o ambiente *in vitro* não só permite como também induz o desenvolvimento dos embriões somáticos ou tecidos embrionários.

Diversos autores vêem trabalhando em cultura de coníferas, na tentativa de induzir organogênese e embriogênese somática, dentre as quais (CAMPBELL & DURZAN, 1976; BORNMAN & JANSSON, 1980; AITKEN *et alii*, 1981; von ARNOLD & ERIKSSON, 1981) com explantes juvenis (BONGA, 1974; SIMOLA & HONKANEM, 1983; NAGNAMI & BONGA, 1985), utilizando estruturas gametofíticas e finalmente (von ARNOLD & ERIKSSON, 1979; PATEL & THORPE, 1984; HAKMAN *et alii*, 1985; GUPTA & DURZAN, 1986; HAKMAN & FOWKE, 1987a; NAGNAMI *et alii*, 1987), com explantes embriônicos.

ABDULLAH *et alii*, 1987 e DUNSTAN *et alii*, 1987, observaram a ocorrência de organogênese em cultura de explantes provenientes de árvores maduras, porém com ex-

plantas maduros não houve o desenvolvimento de embriogênese somática.

Parece que as razões, que permitem alterar a competência do desenvolvimento de tecidos de plantas maduras, ainda permanecem obscuras.

HICKS (1980), define determinação como sendo o processo pelo qual o desenvolvimento potencial, torna-se restrito a uma rota específica de diferenciação, porém, para que haja determinação, há necessidade que ocorra competição celular. Esta última acontece a partir do momento, que se inicia uma seqüência de desenvolvimento que ocorrem após o explante ser exposto à condições de indução.

Segundo AMMIRATO (1985), a indução atua causando uma mudança na competência de determinadas células (indução direta), ou então, desencadeia respostas de diferenciação celular (indução permissiva).

#### **2.4.2. Embriogênese somática direta**

Neste caso, a clonagem de células embriogênicas pré-determinadas, representa um método onde a embriogênese direta pode ser convertida em um sistema que produzirá continuamente pró-embriões em larga escala. Estes pró-embriões, por sua vez, podem se desenvolver facilitando o caminho para a exploração de um sistema de células

pró-embriogênicas determinadas (PEDC), resultando na proliferação de plantas inteiras.

O sistema de clonagem por PEDC é caracterizado por uma fase denominada fase de calo, sendo que este através da aglomeração de células desorganizadas que consistem na proliferação em massas, de pró-embriões.

Características fenotípicas do calo foram descritas por MITRA & CHATUVERDI (1972), em *Citrus aurantiifolia*; LITZ & CONOVER (1982), com *Carica papaya*.

A embriogênese somática em conífera, exceto em *Larix decidua*, tem sido quase que exclusivamente restrita a explantes embriogênicos.

Tecidos embriogênicos de *Picea abies* mostram-se formados por embriões somáticos, apresentando células tubulares, longas e desorganizadas (centros de crescimento) que são embriões somáticos, passando por um processo de reiniciação de embriogênese (BACWAR *et alii*, 1987).

GUPTA & DURGAN (1986), observaram que a semelhança existente entre o tecido obtido *in vitro* e *in vivo* durante a clivagem poliembriônica de coníferas, é tão acentuada, que esse processo tem sido chamado de "poliembriogênese somática".

Em *Pinus* spp, as evidências indicam que a embriogênese é iniciada no tecido do suspensor, o que difere de *Picea abies*, cuja resposta se dá a partir do tecido epidérmico. O tecido do suspensor é mais viável, em estádios

jovens dos pró-embriões em *Pinus*, a partir de embriões pré-cotiledonares. Para *Pinus lambertiana* tem-se cultivado com sucesso, tecido do suspensor de sementes maduras, para a obtenção de tecido embriogênico (GUPTA & DURZAN, 1986).

HAKMAN *et alii*, 1985; GUPTA & DURZAN, 1986; HAKMAN & FOWKE, 1987a; NAGMANI *et alii*, 1987 trabalhando com cultura de embriões imaturos de coníferas, observaram o desenvolvimento de células embrionárias pequenas e polarizadas, semelhantes às que ocorrem no desenvolvimento de embrião zigótico.

Outros autores como SALMIA, 1975; HAKMAN & FOWKE, 1987b, observaram respectivamente em suas pesquisas com coníferas, o desenvolvimento de células gigantes e estruturas multicelulares, apresentando aparente polaridade.

HAKMAN *et alii*, 1985; NAGMANI & BONGA, 1985 afirmam que a formação de calos com cor branca e textura friável, a partir de explantes de árvores maduras caracterizam a presença de células embriogênicas.

O desenvolvimento de células embrionárias pequenas e polarizadas, semelhantes as que ocorrem no desenvolvimento de embriões zigóticos, foram observadas por HAKMAN & FOWKE, 1987a; GUPTA & DURZAN, 1986.

MacDOUGALL *et alii* (1988), observaram estruturas polares e multicelulares, nos calos obtidos a partir de cultura de tecidos de explantes de plantas maduras de *Pinus contorta* var. *latifolia*. Os autores registraram o

insucesso na regeneração dessas plantas e salientam que o significado das células basais gigantes ainda é desconhecido.

Células vacuolizadas e longas, formadas a partir de calos foram observadas em cultura de embriogênese somática registradas por HAKMAN & FOWKE (1987b).

OWENS *et alii* (1982), encontraram células distais pequenas formadas a partir de calos de *Pinus contorta*, bastante semelhantes às primeiras células embrionárias de embriões zigóticos.

#### 2.4.3. Embriogênese somática indireta

Na maioria dos casos de células embriogênicas induzidas e determinadas (IEDC), o estímulo mais apropriado é fornecido pela auxina no meio de cultura. Em muitas espécies pode-se observar que a embriogênese somática via calos, ou cultura de suspensão celular, requerem a aplicação de auxina, exceto em *Coffea arabica*, onde há necessidade de um estímulo utilizando-se citocinina (YASUDA *et alii*, 1985). A auxina, predominantemente usada para a obtenção destes resultados (IEDC), tem sido o 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético).

Para algumas espécies, utiliza-se ANA (ácido naftalenoacético), AIB (ácido indol-butírico) e AIA (ácido indolilacético), com o propósito de estimular as células dos

calos cultivados *in vitro* à diferenciação embriogenética.

WANN *et alii* (1987) observaram que muitas espécies requerem a presença de auxina no meio de cultura inicial, ou seja, o meio em que o explante foi inoculado para induzir a dediferenciação (calo).

Uma vez que o calo embriogênico seja iniciado, a maioria dos sistemas IEPC e PECD, utiliza a auxina para a manutenção e/ou expressão do potencial embriogênico.

Sistemas envolvendo IEDCs são conhecidos pela presença de uma fase de calo, em muitas espécies de lenhosas, onde os calos embriogênicos apresentam-se diferentes dos calos não embriogênicos, sendo que as diferenças entre os dois tipos de calos torna-se perceptível a nível macroscópico em relação a cor, a textura e a morfologia. Estas diferenças entre os calos, podem ser utilizadas para identificar tecidos embriológicos, sendo que mais destacável é a morfologia, onde os calos embriogênicos podem ser reconhecidos, por estarem frequentemente cobertos por embriões somáticos.

WFRB *et alii* (1983) observaram que, de uma maneira geral, os calos embriogênicos tendem a ser uma matriz parenquimatosa friável contendo nódulos ou centros de crescimento, com coloração creme e caracterizados pela presença de uma espessa parede da célula mãe.

Para NABORS *et alii* (1983), o fenótipo característico de embriogênese não está confinado às espécies lenhosas, mas também está presente em cereais, onde a embriogênese bem sucedida, tem sido dependente da habilidade de reconhecer e segregar um calo embriogênico fora de uma cultura mista composta de ambos os calos embriogênicos e não embriogênicos.

## 2.5. Organogêses

Segundo HICKS (1980), a organogênese *in vitro* envolve uma variedade de seqüências complexas de desenvolvimento que resultam da manipulação experimental de partes de uma planta. Essas seqüências, que podem ocorrer em diferentes tipos de explantes, terminam com a formação de órgãos diferenciados ou plantas inteiras. Não se conhece ao certo, a natureza dos eventos iniciais da organogênese, porém sabe-se que as alterações subcelulares em linhagens de células são direcionadas para a formação de primórdios de órgãos ou meristemóides.

Na maioria dos casos, os explantes são capazes de promover a formação de ramos, raízes, ou estruturas florais, quando cultivados em um meio que forneça sais minerais, vitaminas, e uma fonte de carbono, mas que estejam destituídos de hormônios da planta. Estes processos podem

ser denominados de "organogênese adventícia" (CHRISTIANSON & WARNICK, 1983). Outro tipo de organogênese é a "não adventícia" envolvendo a dediferenciação do explante e a indução de novos órgãos a partir da formação de calos na base do explante.

THORPE & MURASHIGE (1970); THORPE (1978; 1980); BONNETT & TORREY (1966) consideram que órgãos adventícios surgem de pequenos grupos de células com citoplasma denso, denominados meristemóides.

Recentemente, agregados de células menos complexas, denominados pró-meristemóides, foram descritos durante os primeiros estágios de formação de ramos adventícios em explantes de cotilédones de *Pinus radiata* (VILLALOBOS *et alii*, 1985).

Segundo FLICK *et alii*, 1983, o fator limitante para a regeneração de espécies arbóreas de Gimnospermas, é freqüentemente, a fonte de explantes. A idade e o estágio fisiológico da matriz, pode contribuir para o sucesso da organogênese em cultura celular. Observam, também, que a transição da planta para a cultura é seriamente estressante, e plantas velhas ou senescentes podem não sobreviver a esta transição.

WODZICKI, 1978; HARVEY & GRASHAM, 1969, consideraram que as variações de estação do ano, podem afetar a formação de calos à partir dos explantes, pois as concentrações endógenas das auxinas podem variar muito. Em Coní-

feras, por exemplo, a primavera e o verão, são considerados ótimas estações para se iniciar a cultura sendo que isto ocorre devido a fatores como: dormência do câmbio ou das gemas laterais, indução do florescimento, etc, que podem alterar respostas e/ou o sucesso da iniciação das culturas.

KAO *et alii*, 1970, observaram uma variação no número de cromossomos das plantas em longos períodos em cultura de suspensão celular.

A organogênese pode ser induzida a partir de suspensão celular ou cultura de calos, e a concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultura é crítica para o controle do crescimento e da morfogênese (FLICK *et alii*, 1983).

Esses autores afirmam que de uma maneira geral, altas concentrações de auxinas com baixas concentrações de citocininas no meio de cultura promovem uma abundante proliferação celular com a formação de calos. É freqüente que a aplicação de 2,4-D, sem outros reguladores, iniciem a formação de calos. Por outro lado, baixa concentração de citocinina no meio de cultura, resulta na indução de organogênese caulogênica. No caso de organogênese rizoqênica, os autores consideram o uso de auxina sozinha ou com citocinina em baixa concentração.

O tipo e a concentração relativa dos reguladores de crescimento são aspectos críticos para o controle da morfoqênese como foi indicado por SKOOG & MILLER (1957).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local de realização do trabalho

Os testes experimentais foram conduzidos nos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais dos Departamentos de Ciências Florestais e de Botânica da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" - Universidade de São Paulo, Campus de Piracicaba - SP.

#### 3.2. Determinação da fonte de explante

O material vegetal utilizado foram gemas de pinheiros, *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr/ & Golf., cedidos pela Duratex Florestal, localizada na Fazenda Monte Alegre em Agudos - SP.

##### 3.2.1. Enxertia seriada e poda sucessiva

As gemas utilizadas como fonte de explante, foram resultantes de duas enxertias seriadas, realizadas no

viveiro. No enxerto foram feitas três podas sucessivas e as gemas foram coletadas e transportadas para o laboratório.

### 3.2.2. Características do explante

As gemas seccionadas de *Pinus*, tinham em média cinco centímetros de comprimento e acículas em estágio de desenvolvimento juvenil ou acículas primárias.

Considerou-se para esta seleção, além do tamanho da gema, a sua coloração, sendo que aquelas que apresentavam-se com coloração verde muito clara foram desprezadas.

### 3.3. Protocolo de esterilização

O protocolo de esterilização aplicado obedeceu a seguinte ordem:

- a. Lavagem das gemas em água corrente;
- b. Secção das bases das gemas;
- c. Mergulho imediato dos explantes, em solução esterilizante, composta por bicloreto de mercúrio ( $HgCl_2$ ) a 0,6%, durante 15 minutos;
- d. Enxaguadura dos explantes em água destilada estéril (por 4 vezes sucessivas);
- e. Lavagem das gemas em suspensão de hipo-

clorito de sódio comercial (Q-BOA) a 30%, durante 15 minutos;

f. Enxaguadura dos explantes em água destilada estéril (por 4 vezes sucessivas).

Após esta última etapa, os explantes foram deixados em frascos contendo água apenas na base, durante 16 horas e então as etapas de b a f foram repetidas, sendo que depois deste procedimento, deu-se início a inoculação dos explantes em meios de cultura previamente estabelecidos.

É importante salientar que os processos de esterilização, a partir da etapa b, foram realizados em câmara de fluxo laminar esterilizada com álcool e fluxo de ar constante.

### 3.4. Inoculação dos explantes

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (2,5 x 25,0 cm), com tampas de metal, contendo 15 ml de meio de cultura. Foram usados, também, frascos de vidro, de 5 cm de diâmetro, com tampa de papel alumínio e 20 ml de meio de cultura sólido e líquido para os dois tipos de recipiente, obedecendo-se rigorosamente as regras de manuseio com o material, evitando ao máximo riscos que pudessem contribuir para um alto índice de contaminação por microrganismos.

### 3.5. Estabelecimento da cultura

Os meios de cultura utilizados foram os de MURASHIGE & SKOOG, 1962 e EUWENS, 1976.

Algumas alterações quali-quantitativas foram feitas em ambos os meios de cultura, tanto para as concentrações salinas como vitamínicas e hormonais.

O complexo vitamínico de MOREL & WETMORE, 1951 foi adicionado aos meios de cultura básicos.

Após a inoculação dos explantes *in vitro*, estes foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e as lâmpadas utilizadas para a iluminação foram GROW LUX, fluorescente luz do dia e incandescentes com fluxo luminoso de aproximadamente 1.000 lux.

O fotoperíodo foi programado para 16 horas luz e 8 horas escuro.

### 3.6. Fases experimentais

#### 3.6.1. Experimento n° 1

1a. Etapa: Os explantes foram inoculados no meio de cultura n° 1 (Tabela 1) e após 40 dias, foram transferidos para o meio de cultura n° 3 (Tabela 3).

**2a. Etapa:** Os materiais transferidos para o meio de cultura n° 3 (Tabela 3), após 30 dias foram transferidos para o meio de cultura n° 4 (Tabela 4).

**3a. Etapa:** Os explantes transferidos para o meio de cultura n° 4 (Tabela 4), permaneceram neste meio por 20 dias e então, foram transferidos para o meio de cultura n° 1 (Tabela 1).

**4a. Etapa:** Depois de 20 dias de cultura em meio n° 1 (Tabela 1), foi feita a repicagem do material, mantendo-os no mesmo meio de cultura, repetidas vezes.

**5a. Etapa:** Análise microscópica dos resultados obtidos no experimento n° 1.

### 3.6.2. Experimento n° 2

**1a. Etapa:** Os explantes foram inoculados no meio de cultura n° 2 (Tabela 2), por um período de 40 dias. Depois deste tempo foram transferidos para o meio de cultura n° 3 (Tabela 3).

**2a. Etapa:** Trinta dias após a transferência dos explantes para o meio de cultura n° 3 (Tabela 3), o material foi analisado microscopicamente e então subdivididos em 2 experimentos: 2A e 2B.

**3a. Etapa:**

**Experimento 2A:** Os calos foram transferidos para o meio de cultura líquido nº 6 (Tabela 6) e mantidos sob agitação lenta, por um período de 20 dias.

**Experimento 2B:** A parte superior do explante foi transferida e mantida no meio de cultura nº 3 (Tabela 3). Após 30 dias as gemas axilares foram isoladas e transferidas para o mesmo meio de cultura, permanecendo por mais 45 dias.

**4a. Etapa:**

**Experimento 2B:** Os calos obtidos foram repicado se transferidos para o meio de cultura nº 2 (Tabela 2), onde permaneceram durante 50 dias, sendo que foram transferidos para o mesmo meio em períodos sucessivos de 10, 20 e 20 dias, com o objetivo de renovar as condições de cultura. Foram realizadas nesta etapa, análise histomorfológica dos calos.

**5a. Etapa:**

**Experimento 2B:** As gemas adventícias formadas, foram individualizadas e transferidas para o meio de cultura nº 5 (Tabela 5), por um período de 20 dias.

### 3.7. Avaliações

#### 3.7.1. Citológicas

Os calos obtidos *in vitro* foram transferidos à uma placa de Petri contendo água destilada e então as células foram dissociadas. Com o auxílio de uma pipeta, uma quantidade da suspensão de células foi colocada sobre uma lâmina de vidro, analisada microscopicamente e com o auxílio de câmara clara foram confeccionadas as Figuras 11 e 12.

#### 3.7.2. Anátomo-histológica

Durante o período de cultura, em intervalos regulares, de acordo com o final do período de cada cultura, amostras foram coletadas e fixadas em formaldeído - ácido acético - álcool (FAA 50) (SASS, 1951), para estudos anátomo-histológicos.

O material foi desidratado em série terciária de álcool butílico e então, embebido em parafina. Após a emblocagem, o material foi cortado em micrótomo de parafina, obtendo-se cortes com 10 a 12 micras, corados com safranina e verde rápido (SASS, 1951), e montados em lâminas histológicas. A seguir o material foi observado e caracterizado em microscópio óptico, fotografados e com auxílio

de câmara clara foram feitas representações esquemáticas (Figura 12).

Tabela 1. Composição do meio de cultura n° 1. Formulação mineral de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Componentes	Concentração
Macronutrientes	(mM)
$\text{NH}_4^+$	20,0
$\text{NO}_3^-$	39,4
$\text{K}^+$	20,0
$\text{Cl}^-$	6,0
$\text{Ca}^{2+}$	3,0
$\text{Na}^+$	0,2
$\text{Mg}^{2+}$	1,5
$\text{SO}_4^{2-}$	1,5
Micronutrientes	( $\mu\text{M}$ )
$\text{Fe}^{2+}$	100,0
$\text{BO}_2$	100,0
$\text{Mn}^{2+}$	100,0
$\text{Zn}^{2+}$	30,0
$\text{I}^+$	5,0
$\text{Cu}^{2+}$	0,1
$\text{Co}^-$	0,1
Mo	1,0
Mesoinositol	100,0 mg/l
Tiamina	0,4 mg/l
Sacarose	30,0 g/l
Agar	7,0 g/l
pH	5,8

Tabela 2. Composição do meio de cultura n° 2. Formulação mineral 50% de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Componentes	Concentração
Macronutrientes	(mM)
NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	10,00
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	19,70
K <sup>+</sup>	10,00
Cl <sup>-</sup>	3,00
Ca <sup>2+</sup>	1,50
Na <sup>+</sup>	0,10
Mg <sup>2+</sup>	0,75
SO <sub>4</sub> <sup>2+</sup>	0,75
Micronutrientes	(μM)
Fe <sup>2+</sup>	50,00
BO <sub>3</sub>	50,00
Mn <sup>2+</sup>	50,00
Zn <sup>2+</sup>	15,00
I <sup>-</sup>	2,50
Cu <sup>2+</sup>	0,05
Co <sup>2+</sup>	0,05
Mo <sup>-</sup>	0,50
Mesoinositol	100,00 mg/l
Tiamina	0,40 mg/l
Sacarose	30,00 g/l
Agar	7,00 g/l
pH	5,80

Tabela 3. Composição do meio de cultura n° 3. Formulação mineral de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). A concentração de macro e micronutrientes igual ao meio de cultura n° 1. O meio foi suplementado com as vitaminas de Morel & Wetmore (1951).

Componentes	Concentração
Ácido Naftaleno Acético (ANA)	2,4 mg/l
Ácido Benzil Adenina (BA)	0,8 mg/l
Sacarose	40,0 g/l
Agar	7,0 g/l
pH	5,8
Vitaminas de MOREL e WETMORE (1951)	
	(mg.l <sup>-1</sup> )
Mioinositol	100,000
Ácido nicotínico	1,000
Piridoxina	1,000
Tiamina HCl	1,000
Biotina	0,010
Ácido fólico	10,000
Pantotenato de cálcio	1,000

Tabela 4. Composição do meio de cultura n° 1 formulação mineral de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). A concentração de macro e micronutrientes igual ao do meio de cultura n° 1 e suplementado com as vitaminas de Morel e Wetmore (1951).

Componentes	Concentração
Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)	1,0 mg/l
Sacarose	40,0 mg/l
Agar	7,0 g/l
pH	5,8
Vitamina de MOREL & WETMORE (1951)	(mg.l <sup>-1</sup> )
Mioinositol	100,000
Ácido nicotínico	1,000
Piridoxina	1,000
Tiamina HCl	1,000
Biotina	0,010
Ácido fólico	10,000
Pantotenato de cálcio	1,000

Tabela 5. Composição do meio de cultura n° 5. Formulação mineral de EEUWENS, 1976.

Componentes	Concentração (mg.l <sup>-1</sup> )
<b>Macronutrientes</b>	
KNO <sub>3</sub>	2.020,000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-
NH <sub>4</sub> Cl	535,000
KCl	1.491,000
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	294,000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	247,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	312,000
<b>Micronutrientes</b>	
Na EDTA	-
FeSO <sub>4</sub>	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	11,200
Fe EDTA	32,500
KI	8,300
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,240
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,016
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	7,200
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,240
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,024
Mesoinositol	100,0 mg/l
Tiamina	0,4 mg/l
Sacarose	30,0 g/l
Agar	7,0 g/l
pH	5,8

Tabela 6. Composição do meio de cultura líquido n° 6. Formulação mineral do meio de cultura de MURASHIGE & SKOOG (1962) e suplementado com as vitaminas de Morel e Wetmore (1951).

Componentes	Concentração
Ácido Naftaleno Acético (ANA)	2,4 mg/l
Ácido Benzil Adenina (BA)	0,8 mg/l
Sacarose	40,0 g/l
pH	5,8
Vitaminas de MOREL & WETMORE (1951)	
	(mg.l <sup>-1</sup> )
Mesoinositol	100,000
Ácido nicotínico	1,000
Piridoxina	1,000
Tiamina HCl	1,000
Biotina	0,010
Ácido fólico	10,000
Pantotenato de cálcio	1,000

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Experimento n° 1

#### 1a Etapa:

O material inoculado permaneceu aparentemente inalterado durante os 40 dias de cultura no meio n° 1. Pode-se atribuir este resultado à alta concentração de macro e microelementos que compõem o meio de cultura de MURASHIGE & SKOOG (1962), impedindo ou retardando quaisquer manifestações morfológicas visíveis do explante, como o alongamento do ramo, o desenvolvimento das gemas axilares e/ou o crescimento de calo.

#### 2a. Etapa:

Trinta dias após o cultivo do explante em meio n° 3, observou-se a formação de calo basal, com coloração branca e aspecto não friável. Notou-se que a presença e/ou a concentração do complexo vitamínico, do carboidrato e de reguladores de crescimento no meio de cultura, tornaram a base do explante capaz de produzir calo, porém,

morfogeneticamente não competente para a diferenciação. Ainda, observou-se que a parte superior do explante ficou totalmente necrosada, restando apenas o calo basal.

A princípio, estes resultados parecem confirmar as afirmações de SKOOG & MILLER, 1957, onde o fator crítico no controle do crescimento e morfogênese, é a concentração dos reguladores de crescimento. Porém, como pode-se observar neste experimento, os reguladores de crescimento foram essenciais para a indução do calo. Contudo, os calos que se formaram eram morfogeneticamente não competentes.

### 3a. Etapa:

Durante o período de vinte dias, os calos transferidos para o meio de cultura n° 4, apresentaram uma progressiva oxidação, caminhando da base para o ápice, atingindo o calo todo no final deste período.

Este resultado indica que a adição e/ou a concentração de 2,4-D, bem como suas interações no meio de cultura, apresentavam um efeito seletivo que se difundiu pelas células do calo.

De acordo com as afirmações de FLICK *et alii*, 1983, o 2,4-D é uma auxina freqüentemente utilizada para induzir a formação de calo no explante.

Como pode ser confirmado neste experimento, o 2,4-D teve uma participação fundamental na proliferação do

calo. Porém a presença dessa auxina num período prolongado, tornou-se prejudicial às células, permitindo a oxidação do calo.

#### **4a. Etapa:**

Os calos totalmente oxidados que foram transferidos para o meio de cultura n° 1, mostraram a formação de pequenos agregados de células brancas na superfície após 20 dias de cultura. Estes agregados de células, quando isolados e transferidos para o mesmo meio de cultura (n° 1), produziram calos amarelo-claros e compactos, morfológicamente semelhantes aos calos obtidos na etapa n° 2 (Figura 1).

Esses resultados concordam com as observações feitas na 3a. etapa do experimento, mostrando uma tendência na ação do 2,4-D, de apresentar efeito seletivo sobre o calo, onde proporcionou a divisão das células, mantendo a capacidade de crescimento dos calos, quando transferidas para o meio de cultura n° 1, totalmente isentos de reguladores de crescimento. Neste meio de cultura, as células não se tornaram competentes para a diferenciação celular.

#### **5a. Etapa:**

Na análise microscópica dos resultados obtidos no experimento n° 1, observou-se a presença de células alongadas, com relação nucleoplasmática (RNP) baixa, indi-

cando serem células parenquimatosas não meristemáticas e não embriônicas (Figura 11).

As células apresentavam-se frouxamente unidas, sem a formação de centros meristemáticos, e sem estruturas que pudessem se assemelhar a tecidos.

A RNP baixa indica um maior volume citoplasmático que o volume nuclear. Portanto, pode-se concluir que o citoplasma encontra-se vacuolizado e pouco denso, o que caracteriza a especialização celular, com redução na totipotência das células meristemáticas ou embriônicas, onde o citoplasma encontra-se mais denso, menos vacuolizado e o volume nuclear mais acentuado, devido à intensa atividade mitótica.

CHALUPA *et alii*, 1976, obtiveram resultados semelhantes quando trabalharam com hipocótilos e radículas de *Pinus banksiana*. Atribuíram estas características das células do calo, à presença e/ou a concentração do ácido naftaleno acético (ANA) no meio de cultura. Os autores afirmam que a auxina aumentou consideravelmente o volume de água das células, tornando-as grandes e portanto, com volume citoplasmático acentuadamente maior que o volume nuclear.

## 4.2. Experimento n° 2

### 1a. Etapa

Os explantes inoculados no meio de cultura

n° 2 apresentaram a formação de calos basais, de coloração amarelo-claro e bastante friáveis, no final de 40 dias.

HAKMAN *et alii*, 1985, afirmam que calos de coloração clara e aspecto friável, formados à partir de explantes de árvores maduras, caracterizam o desenvolvimento de embriões somáticos.

Acredita-se que a concentração de sais minerais, mesmo na ausência de reguladores de crescimento, foi capaz de induzir a formação de calos na base dos explantes. A redução da concentração, além de diminuir a possível seletividade observada no experimento n° 1, não alterou a capacidade de produção endógena de hormônios pelo explante.

#### 2a. Etapa:

A análise microscópica dos calos obtidos no meio de cultura n° 3, foi feita após trinta dias de cultura. Observou-se a presença de células alongadas com RNP baixa, típicas de calo, células isodiamétricas com RNP alta, indiferenciadas (embriônicas) e ainda, agregados celulares em forma globular, semelhantes à fase inicial de desenvolvimento de um embrião zigótico (Figura 12). Os agregados celulares formaram estruturas compactas com protuberâncias semelhantes ao suspensor.

THOMSON (1945) observou que há uma tendência entre as coníferas de apresentarem divisões celulares poliembriônicas. Esta observação associada à de DURZAN & CHA-

LUPA (1976), de que as células de *Pinus banksiana* quando cultivadas em meio de cultura embriogênico, adquirem formas ovais, com polaridade nitidamente precedendo a divisão celular. As células filhas permanecem em agregados que formam o suspensor e o proembrião, confirmando a seqüência de células obtidas neste experimento (Figura 12).

Devido a formação de calo basal, e intumescimento das gemas axilares da parte superior do explante, o experimento foi dividido em 2 partes: experimento 2A e 2B.

O experimento 2A objetivou avaliar a capacidade dos calos para a indução de embriogênese somática indireta. O experimento 2B, avaliou a capacidade da parte superior do explante para a organogênese caulogenética.

### 3a. Etapa:

#### Experimento 2A

Os calos cultivados em meio de cultura líquido(nº 6), sob agitação. Após 20 dias de cultura se mostraram escuros e mortos, sem nenhuma indicação de crescimento ou de diferenciação, após análise microscópica.

Transferências em curto prazo, poderiam impedir a morte das células embriônicas. Isto seria necessário para evitar estresse nutricional, como também, manter condições do meio de cultura mais adequados.

### Experimento 2B

A parte superior do explante, isolada do calo basal, foi mantida no meio de cultura n° 3, por 30 dias, quando observou-se um aumento gradativo no intumescimento das gemas axilares.

Estas gemas axilares foram isoladas e permaneceram no meio de cultura n° 3 por mais 15 dias. Então, mostraram a formação de calo basal, friável, de coloração amarelo citrino e de rápido crescimento (Figura 2).

As acículas das gemas axilares necrosaram totalmente no final de 45 dias e o explante foi totalmente recoberto. O rápido crescimento do calo basal, devido à alta taxa de divisão celular, causou no explante, um estresse fisiológico, resultando oxidação fenólica total das gemas axilares.

O estresse do explante pode ser atribuído à não diferenciação de vasos condutores pelas células do calo não ocorrendo a condução de nutrientes para o explante, ocasionando desta forma, sua morte por oxidação.

#### 4a. Etapa:

#### Experimento 2B

Após os dez primeiros dias, os calos transferidos para o meio de cultura n° 2, apresentaram pontos clorofilados sob toda superfície. Nesta fase, observou-se uma acentuada redução na taxa de crescimento do calo. O que

pode ser explicado como sendo uma consequência do início da diferenciação celular. Este resultado está de acordo com CROCOMO (1974), que quanto mais diferenciadas as células menor a taxa de divisão celular.

Estes calos foram transferidos para o mesmo meio de cultura por mais 2 vezes, num período de vinte dias cada uma. Na primeira transferência, iniciou-se a formação de gemas adventícias a partir dos pontos clorofilados (Figuras 3 e 4). Na segunda transferência, já se observou um desenvolvimento mais acentuado das gemas adventícias (Figura 4).

No final de cinquenta dias de manutenção neste meio de cultura, observou-se um aumento no número de gemas adventícias formadas (Figura 5).

Estes resultados podem ser atribuídos à redução do balanço hormonal e da concentração de sais minerais que permitiram às células tornarem-se competentes na indução de caulogênese. Para CROCOMO (1974), a diferenciação celular é resultante da existência de interações complexas entre o patrimônio genético contido em cada célula e as características estruturais e bioquímicas da planta. Estas definições contribuem para as explicações dos resultados obtidos neste experimento. Embora HICKS (1980), tenha citado que não se conhece ao certo a natureza dos eventos iniciais da organogênese, porém acredita-se que alterações

subcelulares são direcionadas para a formação de órgãos ou meristemóides.

THORPE & MURASHIGE (1970), afirmam que órgãos adventícios surgem de pequenos grupos de células com citoplasma denso, o que está de acordo com os resultados obtidos neste experimento.

Os calos foram analisados histologicamente e observou-se a presença de centros meristemáticos (promeristemas), com células isodiamétricas com RNP alta formando um tecido esférico e maciço, tipicamente meristemático, sendo que destes originavam-se gemas adventícias com primórdios foliares.

Os centros meristemáticos eram rodeados por células alongadas com RNP baixa indiferenciadas e não determinadas, características de calo (Figuras 6, 7 e 8).

#### **5a. Etapa:**

##### **Experimento 2B**

As gemas isoladas no meio de cultura n° 5, alongaram-se consideravelmente, cerca de 10 cm de comprimento, após 20 dias de cultura. Observou-se a formação de calo na base da gema alongada. A partir desta, novas gemas se desenvolveram. Isto, demonstra que mesmo em um meio de cultura com concentração salina distinta, a competência para a diferenciação das células do calo foi mantida, ou seja,

sua informação morfogênética pré-estabelecida, não se modificou (Figuras 9 e 10).



Figura 1. Calo compacto fenotipicamente não embriogênico.

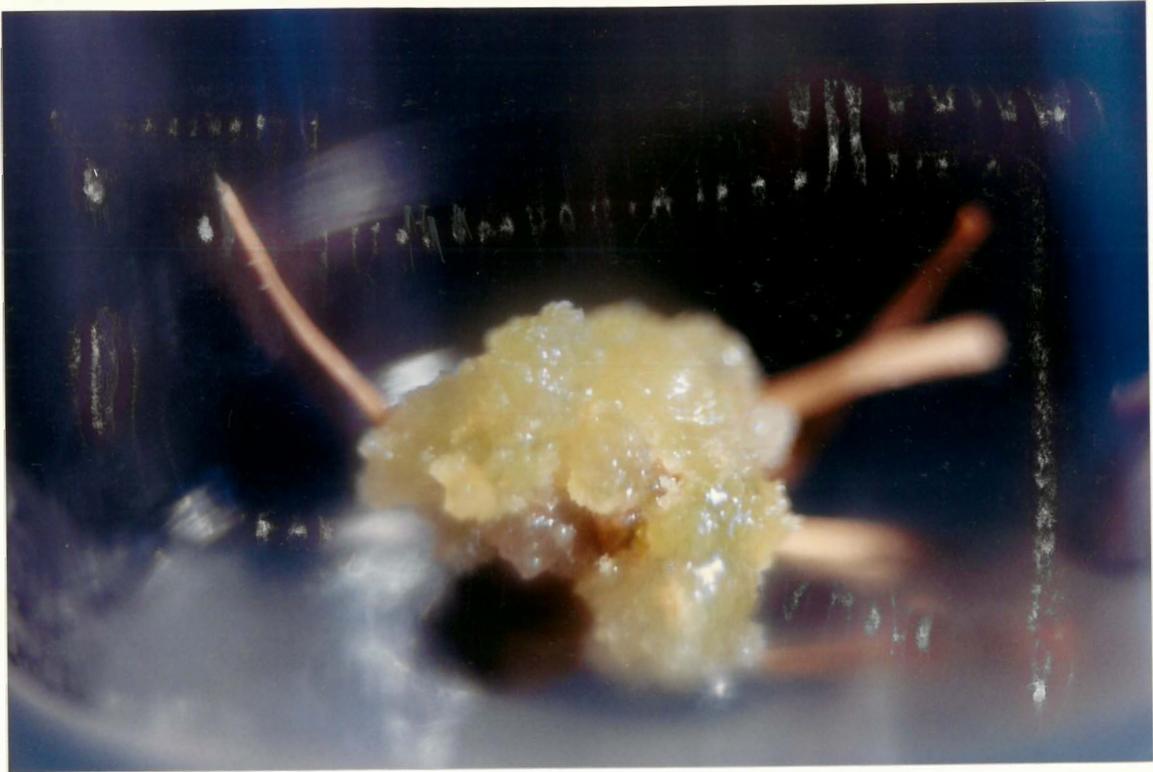


Figura 2. Calo gelatinoso e friável fenoticamente embriogênico.

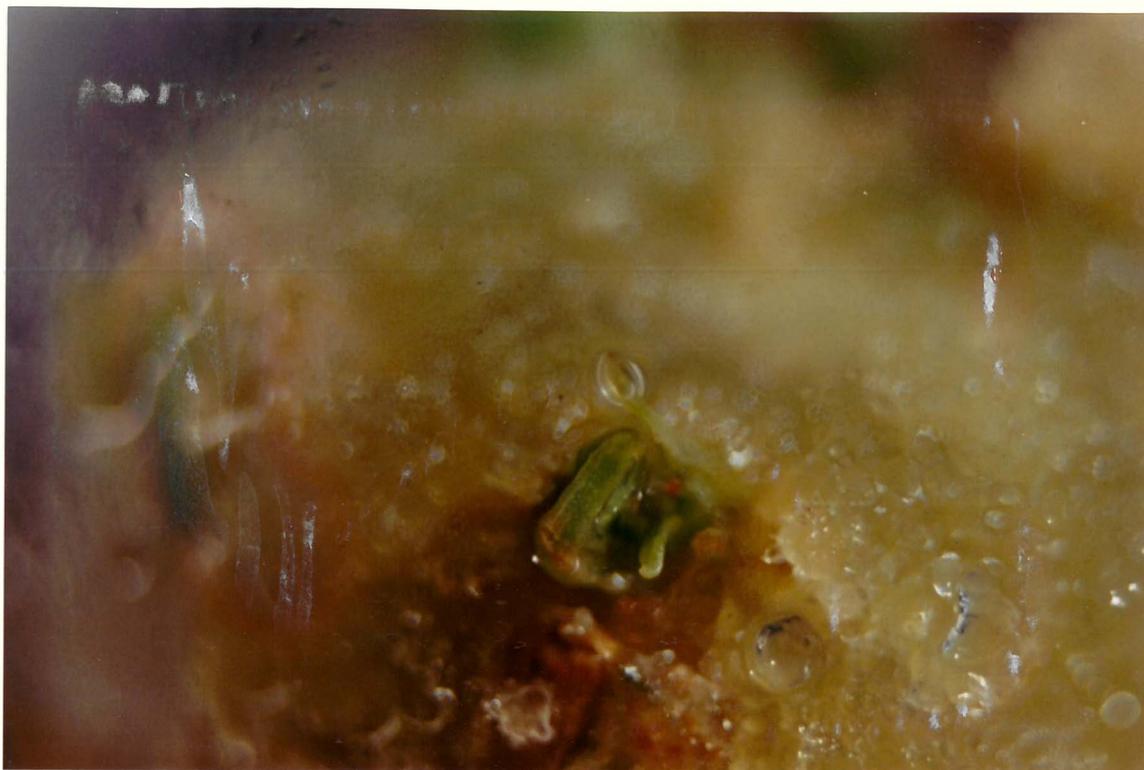


Figura 3. Início de caulogênese indireta. Observa-se a formação de gemas adventícias a partir de pontos clorofilados.

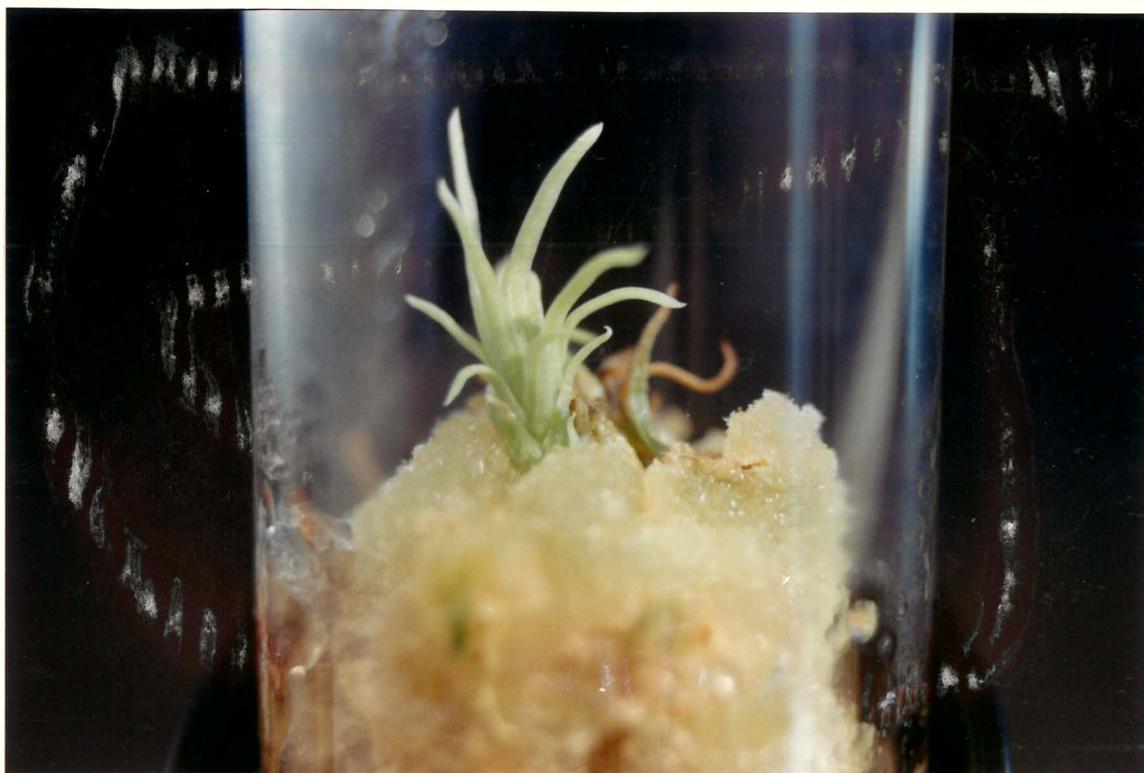


Figura 4. Caulogênese indireta observando-se o desenvolvimento de gemas adventícias.

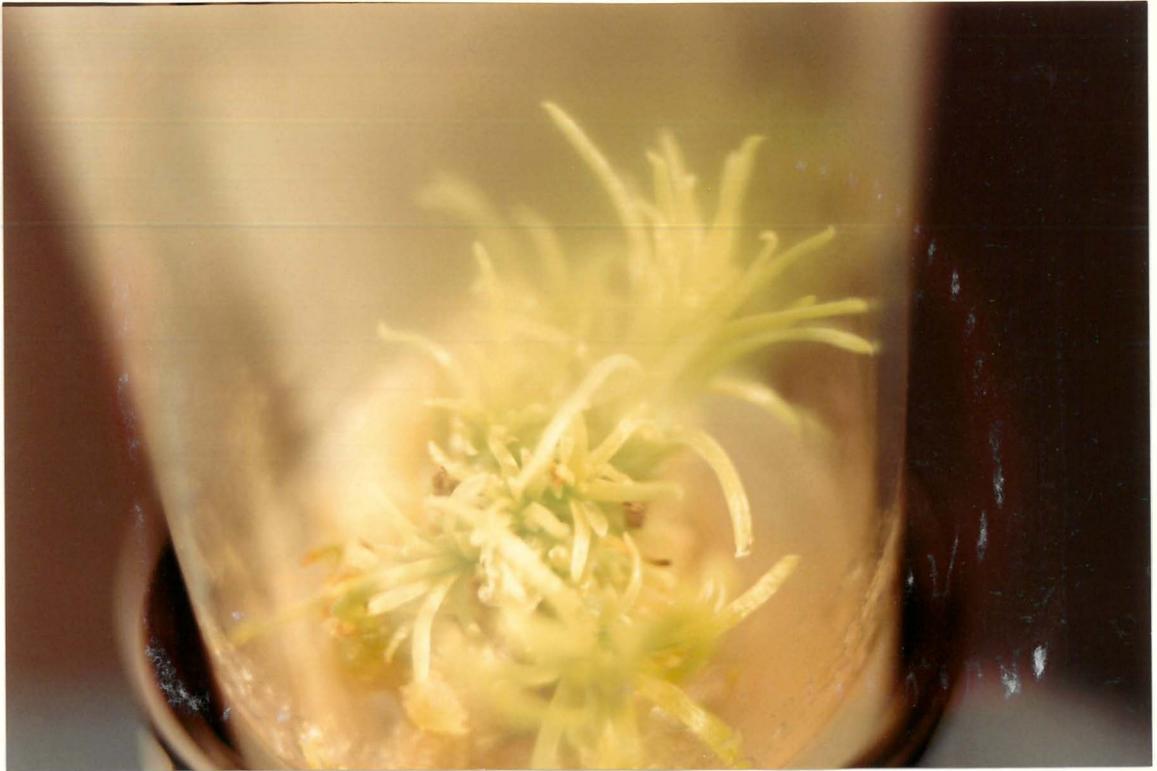


Figura 5. Caulogênese indireta. Multiplicação de gemas adventícias.

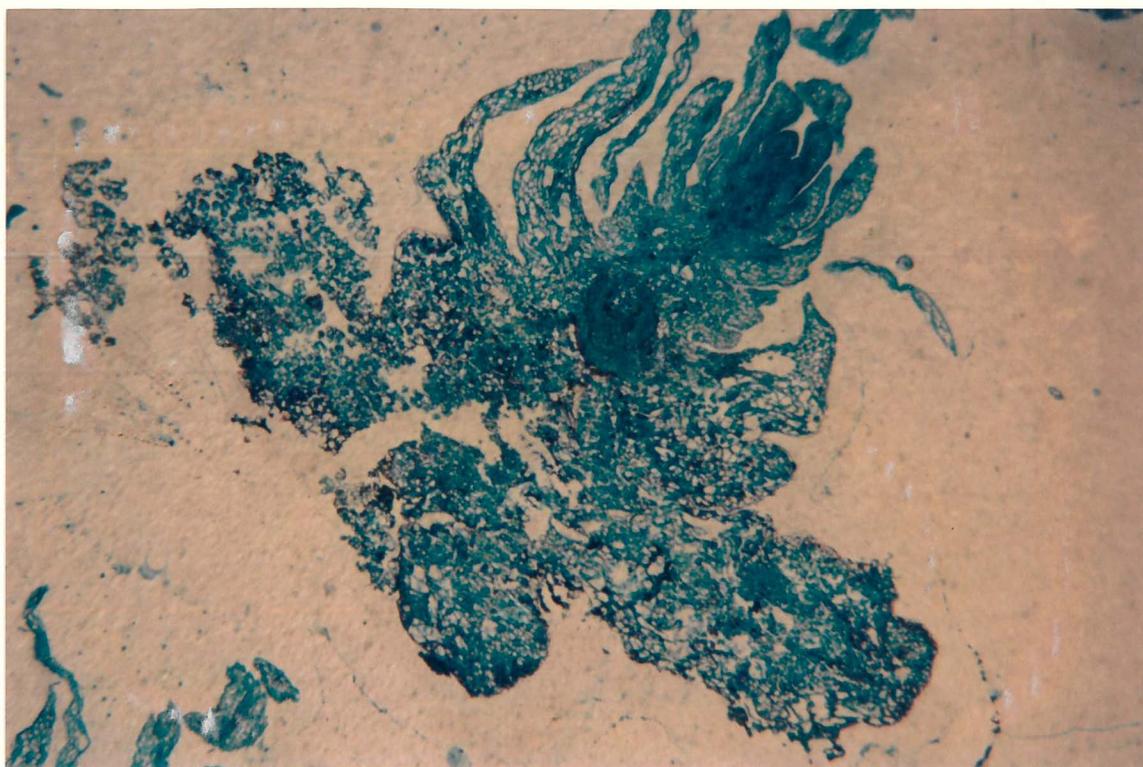


Figura 6. Análise histomorfológica de calo organogénico, mostrando formação de gemas adventícias com primórdios foliares e centros meristemáticos (40x).

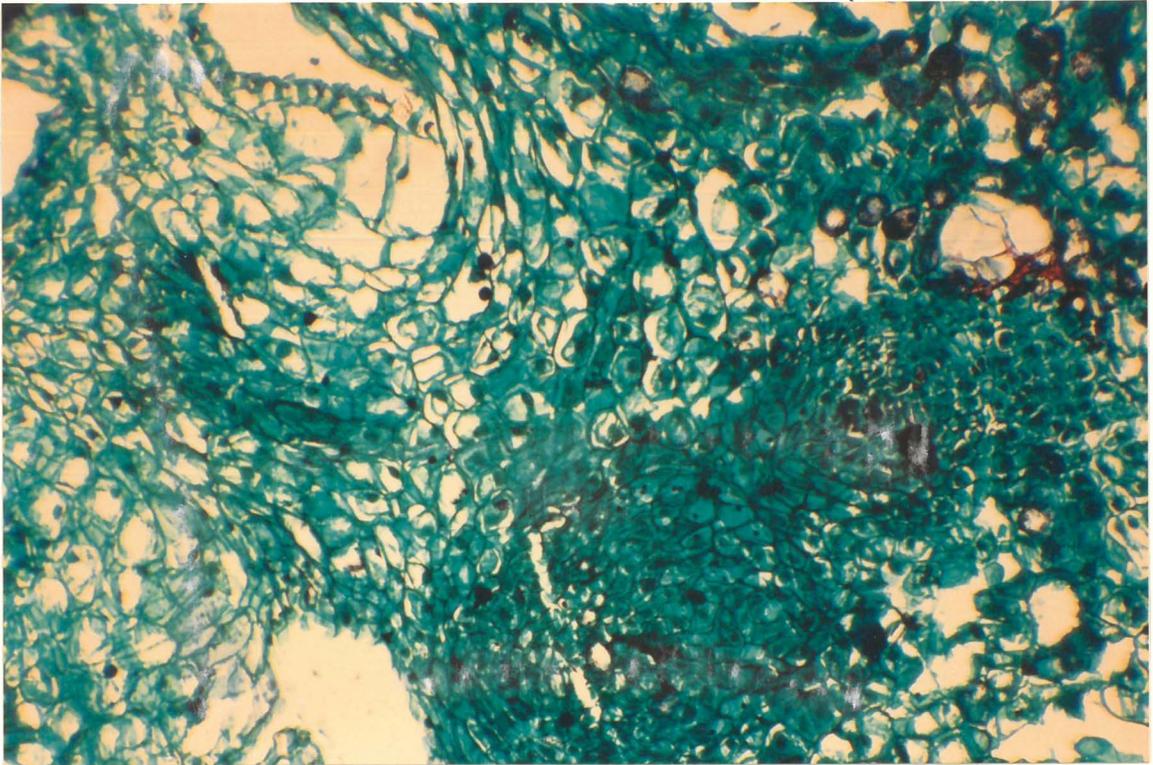


Figura 7. Análise histomorfológica das células dos centros meristemáticos (100x).

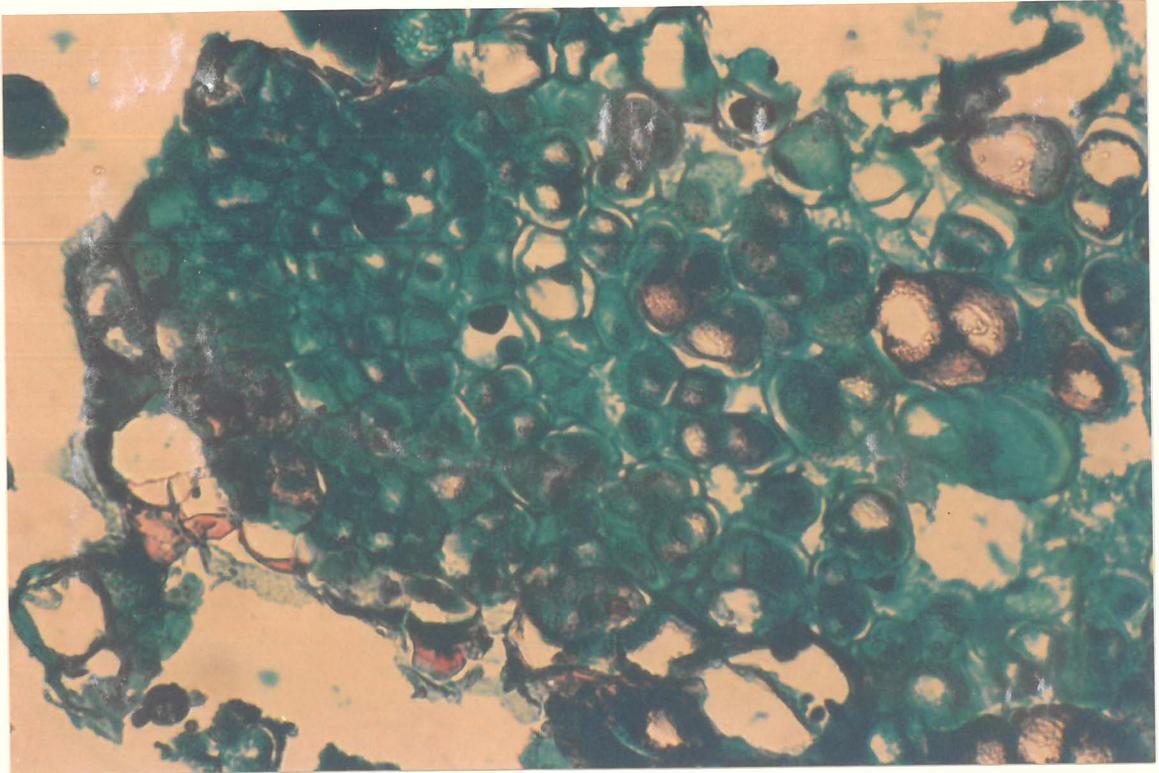


Figura 8. Detalhe do centro meristemático, observando-se células isodiamétricas (400x).



Figura 9. Gemas adventícias obtidas a partir de caulogênese indireta em início de alongamento.



Figura 10. Gemas adventícias alongadas com formação de calos na base. Observar o desenvolvimento de gemas a partir do calo basal.

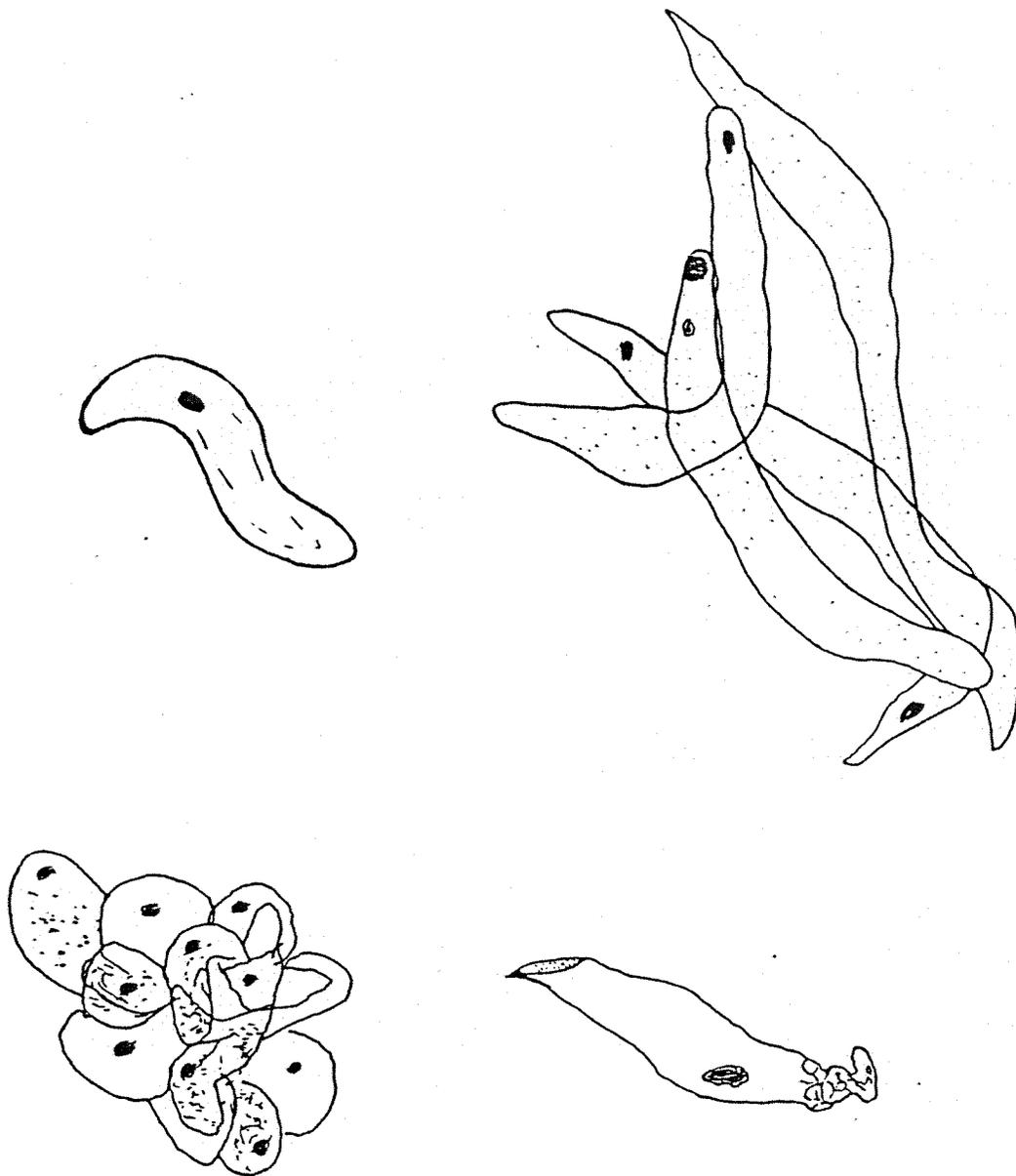


Figura 11. Observam-se células alongadas, com RNP baixa, indicando serem células parenquimatosas não meristemáticas e não embriogênicas.

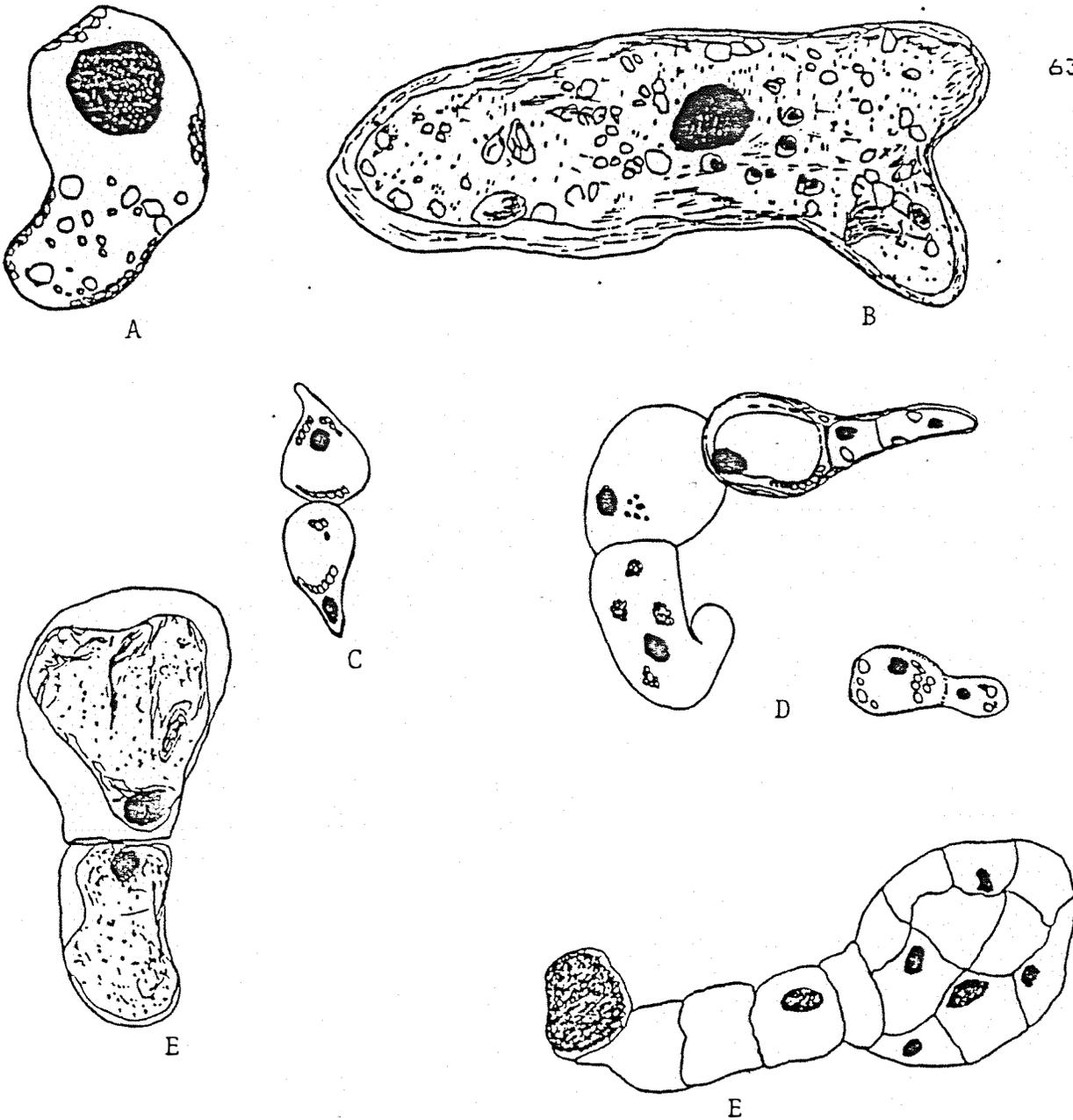


Figura 12. Células isoladas de calo.

- A. Célula com RNP alta de início de polarização.  
 B. Célula polarizada com o polo vegetativo bifurcado.  
 C. Células individualizadas após passarem por mitose, retornando ao estágio de polarização.  
 D. Células não individualizadas após se dividirem, formando agregados celulares polarizados.  
 E. Detalhe do agregado evidenciando células com RNP alta.  
 F. Agregado multicelular polarizado, evidenciando o suspensor e o corpo do embrião com protoderme, semelhante aos estágios de desenvolvimento de um embrião zigótico.

## 5. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas neste experimento foram as seguintes:

1. A seqüência de transferências: 1/2 MS para MS + ANA + BA + vitaminas de Morel + 40 g de sacarose para o meio de cultura de Eeuwens, é necessária e fundamental para a indução de caulogênese em *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. & Golf.

2. A organogênese indireta apresentou alta capacidade de multiplicação de gemas adventícias e de gemas axilares.

3. A coloração dos calos clara ou branca, gelatinosos e friáveis, são fortes indicadores de morfogênese.

4. Análise anátomo-histológica mostra-se essencial para oferecer informações do comportamento das células.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, A.A.; YEOMAN, M.M.; GRACE, J. Micropropagation of mature Calabrian pine (*Pinus brutia* Ten.) from fascicular buds. *Tree Physiol.*, **3**: 123-36, 1987.
- AITKEN, J.; HORGAN, K.J.; THORPE, T.A. Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. *Canadian Journal of Forest Research*, Ottawa, **11**(1): 112-7, 1981.
- AMMIRATO, P.V. Patterns of development in culture. In: "Tissue Culture in Agriculture", pp. 9-29 (R.R. Henke, K.W. Hughes, M.J. Constantin and A. Hollaender, eds.). Plenum Press. New York, 1985.
- BACWAR, M.R.; NOLAND, T.L.; WANN, S.R. Somatic embryo development and plant regeneration from embryogenic Norway spruce callus. *Tappi*, **78**: 155-60, 1987.
- BONGA, J.M. *In vitro* culture of microsporophyll and megagametophyte tissue of *Pinus*. *In Vitro*, **9**: 270-277, 1974.

- BONNETT, H.T. & TORREY, J.G. Comparative anatomy of endogenous bud and lateral root formation in *Convolvulus arvensis* roots cultured *in vitro*. *Am. J. Bot.*, 53: 496-507, 1966.
- BORNMAN, C.H. & JANSSON, E. Organogenesis in cultured *Pinus sylvestris* tissue. *Z. Pflanzenphysiol.*, 96: 1-6, 1980.
- BUSBY, C.H. & GUNNING, B.E.S. Observations on pre-prophase bands of microtubules in uniseriate hairs, stomatal complexes of sugar cane, and *Cyperus* root meristems. *Europ. J. Cell. Biol.*, 21: 214-23, 1980.
- CAMPBELL, R.A. & DURZAN, D.J. Vegetative propagation of *Picea glauca* by tissue culture. *Can. J. For. Res.*, 6: 240-43, 1976.
- CHALUPA, V.; DURZAN, D.J., VITHAYASAL, C. Growth and metabolism of cells and tissue of jack pine (*Pinus banksiana*). 2. The quantitative analysis of the growth of callus from hypocotyls and radicles. *Can. J. Bot.*, 54, 1976. This issue.
- CHRISTIANSON, M.L. & WARNICK, D.A., 1983. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Dev. Biol.*, 95: 288-93, 1983.
- CHRISTIANSON, M.L., WARNICK, D.A., CARLSON, P.S. A morphogenetically competition soybean suspension culture. *Science*, 222: 632-34, 1983.

- CROCOMO, O.J. Bioquímica da diferenciação celular. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. ESALQ/USP/CNEN, Piracicaba-SP, 1974. 325p.
- DUNSTAN, D.I.; MOHAMMED, G.H., THORPE, T.A. Morphogenetic response of vegetative bud explants of adolescent and mature *Picea glauca* (Moench) Voss *in vitro*. *New Phytol.* **106**: 225-36, 1987.
- DURZAN, D.J.J., PHEL, A.J.M.; RAMAIAH, P.K. Metabolism of uracil by germinating jack pine seedlings. *Can. J. For. Res.*, **3**: 209-21, 1973.
- DURZAN, D.J. & CAMPBELL, R. Prospects for the mass production of improved stock of forest trees by cell and tissue culture. *Can. J. For. Res.*, **4**: 151-74, 1974.
- DURZAN, D.J. & CHALUPA, V. Growth and metabolism of cells and tissues of jack pine (*Pinus banksiana*). 4. Changes in amino acids in callus and in seedlings of similar genetic origin. *Can. J. Bot.*, **54**, 1976. This issue.
- EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. *Physiol. Plant*, **36**: 23-8, 1976.
- FARJON, A.; LEIDEN, E.J.; BRILL Dr.W. *Blackhuys*, 1984. 220p.
- FLICK, C.E.; EVANS, D.A., SHARP, W.R. Organogenesis. In: *Handbook of Plant Cell Culture*. Volume I, Cap. 2, p.13-81. Macmillan Publishing Co., New York, 1983.

- GALATIS, B. Microtubules and guard cell morphogenesis in *Zea mays* L. *J. Cell. Sci.*, **45**: 211-14, 1980.
- GALATIS, B. & MITRAKOS, K. On the differential division and pre-prophase microtubule bands involved in the development of stomata of *Vigna sinensis*. *J. Cell. Sci.*, **37**: 11-37, 1979.
- GREEN, P.B. Organogenesis - a biophysical view. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**: 31-52, 1980.
- GRIMM, I.; SACHS, H.; ROBINSON, D.G. Structure, synthesis and orientation of microfibrils. II. The effects of colchicine on the wall of *Oocystis solitaria*. *Cytobiologie*, **14**: 61-74, 1976.
- GUNNING, B.E.B. Microtubules and cytomorphogenesis in a developing organ: The root primordium of *Azolla pinnata*. In: Cytomorphogenesis in plants (Kiermayer, O., ed.). Springer-Verlag, Wien New York. Cell Biology Monographs, **8**: 301-25, 1981.
- GUNNING, B.E.S., HUGHES, J.E., WARDHAM, A.R. Formative and proliferative cell divisions, cell differentiation, and developmental changes in the meristem of *Azolla* roots. *Planta*, **143**: 121-44, 1978.
- GUPTA, P.K. & DURZAN, D.J. Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. *Biotechnology*, **4**: 643-45, 1986.
- HAKMAN, I. & FOWKE, L.C. An embryogenic cell suspension culture of *Picea glauca* (white spruce). *Plant Cell. Rept.*, **6**: 20-22, 1987a.

- HAKMAN, I. & FOWKE, L.C. Somatic embryogenesis in *Picea glauca* (white spruce) and *Picea mariana* (black spruce). *Cab. J. Bot.*, 65: 656-659, 1987b.
- HAKMAN, I.L.C.; FOWKE, S. von ARNOLD; ERIKSSON, T. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Sci.*, 38: 53-9, 1985.
- HARDHAM, A.R.; GREEN, P.B.; LANG, J.M. Reorganization of cortical microtubules and cellulose deposition during leaf formation in *Graptopetalum paraguayense*. *Planta*, 149: 181-95, 1980.
- HARVEY, A.E. & GRASHAM, J.L. Procedures and medium for obtaining tissue cultures of 12 conifer species. *Can. J. Bot.*, 47: 547-49, 1969.
- HEPLER, P.K. & PALEVITZ, B.A. Microtubules and microfilaments. *A. Rev. Pl. Physiol.*, 25: 309-62, 1974.
- HICKS, G.S. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *Bot. Rev.*, 46: 1-23, 1980.
- KAGEYAMA, P.Y. Melhoramento genético de pinheiros tropicais no Brasil. Circular Técnica, IPEF, Piracicaba, 111(8): 1-12, 1980.
- KAO, K.N.; MILLER, R.A.; GAMBORG, O.L., HARVEY, B.L. Variations in chromosome number and structure in plant cells grown in suspension cultures. *Can. J. Genet. Cytol.*, 12: 297-301, 1970.

- LAMB, A.F.A. *Pinus caribaea*. Oxford, Department of Forestry, 1v., 1973.
- LITZ, R.E. & CONOVER, R.A. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus. *Plant Sci. Lett.*, 26: 153-58, 1982.
- MacDOUGALL, S.C.; ELLIS, S.M.; TAYLOR, I.E.P. The occurrence of polar structures in callus cultures from mature lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*). 66: 2595-96, 1988.
- MARCHANT, H.J. Microtubules, cell wall deposition and the determination of plant cell shape. *Nature*, 278: 167-68, 1979.
- MITRA, G.C. & CHATURVEDI, H.C. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of *in vivo* - grown emasculated flower buds of *Citrus* spp. *Bull. Torrey Bot. Club*, 99: 184-89, 1972.
- MOREL, G.M. & WETMORE, R.H. Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.*, 38: 141-43, 1951.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Pl.*, 15: 473-97, 1962.
- NABORS, M.W.; HEYSER, J.W., DYKES, T.A. DEMOTT, K.J. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal cultures. *Planta*, 157: 385-91, 1983.

- NAGMANI, R.; BECWAR, M.R.; WANN, S.R. Single cell origin and development of somatic embryos in *Picea abies* (L.) Karst (Norway spruce) and *P. glauca* (Moench) Voss (white spruce). *Plant Cell Rpt.*, 6: 157-59, 1987.
- NAGMANI, R. & BONGA, J.M. Embryogenesis in immature sub-cultured callus of *Larix decidus*. *Can. J. For. Res.*, 15: 1088-91, 1985.
- OTA, T. The role of cytoplasm in cytokinesis of plant cells. *Cytologia*, 26: 428-47, 1961.
- OWENS, J.N., SIMPSON, S.J.; MOLDER, M. Sexual reproduction of *Pinus contorta*. II. Postdormancy ovule, embryo, and seed development. *Can. J. Bot.*, 60: 2071-83, 1982.
- PACKARD, M.J. & STACK, S.M. The pre-prophase band: possible involvement in the formation of the cell wall. *J. Cell. Sci.*, 22: 403-11, 1976.
- PATEL, K.R. & THORPE, T.A. *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 3: 131-42, 1984.
- PICKETT-HEAPS, J.D. Plant microtubules. In: Dynamic aspects of plant ultrastructure (ROBARDS, A.W., ed.). London-New York, MacGraw-Hill, 1974.
- PICKETT-HEAPS, J.D. & NORTHCOTE, D.H. Organization the microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristems. *J. Cell Sci.*, 1: 109-20, 1966.

- RAGHAVAN, V. Embryogenesis in Angiosperms. Cambridge University Press. Cambridge, 1986. pp.115-52.
- SALMIA, M.A. Cytological studies on tissue culture of *Pinus cambra*. *Physiol. Plant.*, 33: 58061, 1975.
- SASS, J.E. Botanical Microtechnique. Iowa, The Iowa State Coll. Press, 1951.
- SHARP, W.R., SONDAHL, M.R., CALDAS, L.S., MARAFFA, S.B. The physiology in vitro asexual embryogenesis. *Hort. Rev.*, 2: 288-310, 1980.
- SHARP, W.R., EVANS, D.A.; SONDAHL, M.R. Applications of somatic embryogenesis to crop improvement. In: Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture (A. Fujiwata, ed.). JapanAssoc. for Plant Tissue Culture, Tokyo, 1982.
- SIMOLA, L.K. & HONKANEN, J. Organogenesis and fine structure in megagametophyte callus lines of *Picea abies*. *Physiol. Plant.*, 59: 551-561, 1983.
- SINNOTT, E.W. & BLOCH, R. Division in vacuolate plant cells. *Amer. J. Bot.*, 28: 225-232, 1941.
- SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultivated in vitro. In: Biological Action of Growth Substances. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11: 118-31, 1957.
- THOMSON, R.H. Polyembryony, sexual and asexual embryo initiation and food supply. *Trans. R. Soc. Can.*, 39: 143-69, 1945.

- THORPE, T.A. & MURASHIGE, T. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus. *Can. J. Bot.*, **48**: 276-285, 1970.
- THORPE, T.A. Physiological and biochemical aspects of organogenesis *in vitro*. In: THORPE, T.A., ed. *Frontiers*, 1978.
- THORPE, T.A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological, and biochemical aspects. In: VASIL, I.K., ed. *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*. New York, 1980. Academic Press, p.71-111.
- VENVERLOO, C.J.; HORENKAMP, P.H.; WEEDA, A.J.; LIBBENGA, K. R. Cell division in *Nautilocalyx* explants. 2. *Pflanzenphys*, **100**: 161-64, 1980.
- VIDAL, J.J. *El pino: algunas especies de interese económico*. México, UTEHA, 1962. 233p.
- VILLALOBOS, V.M., YEUNG, E.C., THORPE, T.A. Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons *in vitro*. *Can. J. Bot.*, **63**: 2172-76, 1985.
- von ARNOLD, S. & ERIKSSON, T. Induction of adventitious buds on embryos of Norway spruce grown *in vitro*. *Physiol. Plant.*, **45**: 39-34, 1979.
- von ARNOLD, S. & ERIKSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.*, **59**: 870-74, 1981.

- WANN, S.R.; JOHNSON, M.A., NOLAND, T.L., CARLSON, J.A. Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic callus of *Picea abies* (L.). *Karst. Plant Cell Rpt.*, 6: 39-42, 1987.
- WAREING, P.G. & PHILLIPS, I.D.J. Growth & differentiation in Plants. Program press, Oxford, 1981. 343p.
- WEBB, D.T.; RIVERA, M.E.; STARSZAB, E., MATOS, J. Callus initiation and organized development from *Zamia pumila* explants. *Ann. Bot.*, 51: 711-17, 1983.
- WODZICKI, T.J. Seasonal variation of auxin in stem cambial region of *Pinus silvestris*. *Acta Soc. Bot. Polon.*, 47: 225-31, 1978.
- YASUDA, T.Y. & YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell. Physiol.*, 26: 595-97, 1985.