



Luis Pedro Barrueto Cid

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE ALHO (CV. CHONAN),
VIA SUSPENSÃO CELULAR.

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pelo candidato Luis Pedro Barrueto Cid e aprovada pela Comissão Julgadora.

Rolf Dieter Illg

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rolf Dieter Illg

1991-DE

CAMPINAS, SP

1991

C486r
16036/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A dúvida, é a sala de espera do conhecimento.

Pensamento Chinês

A imaginação, é mais importante do que o conhecimento.

A. Einstein.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela oportunidade concedida para a realização deste curso, bem como, pelo suporte financeiro do projeto de tese.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela bolsa de estudo concedida.

Ao Professor Dr. Rolf Dieter Illg, pela oportunidade e confiança brindada para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Aquiles E. Piedrabuena, pela sua contribuição na análise estatística dos dados.

Aos Professores Dr. George John Shepherd e Dr. Ladaslav Sodek, pela colaboração na elaboração do abstract.

Aos colegas: Nilma Viguetti, Ricardo Faria, Eduardo Del Grossi e Antonio T. Martins, pela amizade e convívio durante o curso.

Às técnicas de laboratório: Antonia Nadir Dallacqua e Edna Rosa dos Santos pela colaboração e amizade.

Abreviaturas usadas

AIA	ácido 3-indolilacético
AIB	ácido indolilbutírico
ANA	ácido naftalenoacético
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Picloram	ácido 4-amino 3,5,6 tricloropicolínico
DNA	ácido desoxiribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
_t RNA	ácido ribonucleico de transferência
BAP	6-benzilaminopurina
2iP	isopenteniladenina
KIN	6-furfurilamino-purina
MES	ácido (2-(N-morfolino)etanosulfônico)
(9R-5P)iP	ribotídio N ⁶ (L ² -isopentenil) adenosina-5'-monofosfato
(9R-5'P)Z	ribotídio t-zeatina ribosídio-5'-monofosfato
(9R)iP	ribosil N ⁶ (L ² -isopentenil)adenosina
(9R)Z	ribosil t-zeatina ribosídio
(7G)Z	glucosil t-zeatina 7-glucosídio
B5	meio de Gamborg, O.L; Miller, R.A. & Ojima, k., 1968
LS	meio de Linsmaier, E.M. & Skoog, F., 1965
MS	meio de Murashige, T. & Skoog, F., 1962
ER	meio de Eriksson, T., 1965

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO	1
I MATERIAL E MÉTODOS	13
I.1 Descrição do material vegetal.	14
I.2 Assepsia do explante.	14
I.3.0 Estabelecimento e manutenção de células em meio líquido..	16
I.3.1 Experimentos preliminares.	16
I.3.2 Regeneração de plântulas a partir de calos envelhecidos de Branco Mineiro e Chonan, (BM, Ch).	16
I.3.3 Indução de calos a partir de brotações regeneradas "in vitro" de BM e Ch.	16
I.3.4 Obtenção de calos aclorofiláceos friáveis diante 2,2,4-.....	17
I.3.5 Indução da suspensão celular em meio líquido: cultura primária.	18
I.3.5.1 - Composição do meio líquido	18
I.3.5.2 - Preparação do inóculo	19
I.3.6 Curvas de crescimento: efeito de diferentes combinações de 2,4-D e BAP.	20
I.3.6.1 - Pesagem do inóculo.	21
I.3.7 Efeito do MES no crescimento da cultura primária.	21
I.3.8 Efeito do rifaldin no crescimento da cultura primária.	22
I.3.9 Comparação do efeito entre sacarose PA e sacarose comercial, sobre o crescimento da cultura primária.	22
I.3.10 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio, sobre o crescimento da cultura primária.	23
I.3.11 Avaliação do pH do meio de calos friáveis.	23
I.3.12 Contaminação bacteriana nas suspensões celulares.	24
I.4. Plaqueamento celular e indução de calos.	25
I.4.1 Influência do ANA e BAP sobre a indução de calos.	25

I.4.2	Influência do volume de suspensão celular na indução de calos.	26
I.4.2.1	Verificação da viabilidade dos microcalos em meio MSP durante o plaqueamento. ..	27
I.4.3	Efeito do tamanho de placa sobre a indução de calos.	27
I.4.4	Efeito da superfície do meio e concentração de agar sobre a indução de microcalos.	28
I.4.5	Efeito de diferentes citocininas autoclavadas, aplicadas via "mistura", na indução de microcalos.	28
I.4.6	Efeito de diferentes citocininas ultrafiltradas, aplicadas via "mistura", na indução de microcalos.	29
I.4.7	Efeito de diferentes citocininas, ultrafiltradas, a partir de inóculo de suspensão celular via seringa, sobre a indução de microcalos.	29
I.4.8	Comparação do efeito entre o método de aplicação por "seringa", sobre o crescimento de calos.	29
I.5.	Regeneração.	30
I.5.1	Crescimento de Calos.	30
I.5.2	Indução de brotações.	31
I.5.3	Transferência de calos para concentrações crescentes de adenina.	31
I.5.4	Efeito do amido de milho, no crescimento de brotações de calos.	32
I.5.5	Efeito do aumento da concentração de açúcar, no crescimento das brotações.	32
I.5.6	Efeito do Ag NO ₃ sobre a indução de brotações. ..	32
I.6	Crescimento e bulbificação de plântulas.	33
I.6.1	Efeito de diferentes níveis de sacarose sobre a bulbificação.	33
I.6.2	Efeito do ácido indolbutírico sobre a bulbificação.	34

II	RESULTADOS	35
II.1	Dos experimentos sobre contaminação por fungo	35
II.2	Estabelecimento e manutenção de células em meio líquido..	37
2.1.	Regeneração de plântulas a partir de calos envelhecidos de Branco Mineiro e Chonan.	37
2.2.	Indução de calos a partir de brotações regeneradas <i>in vitro</i> de BM e Ch.	37
II.3	Estabelecimento e manutenção de células em meio líquido ..	38
3.1.	Obtenção de calos aclorofiláceos friáveis mediante 2,4-D.	38
II.4	Curvas de crescimento.	39
4.1.	Efeito de diferentes combinações de 2,4-D e BAP. ..	39
4.2.	Efeito do MES no crescimento da cultura primária. ..	49
4.3.	Efeito do rifaldin no crescimento da cultura primária.	53
4.4	Comparação entre sacarose PA e sacarose comercial não PA, sobre o crescimento da cultura primária. ..	58
4.5	Efeito de diferentes fontes de nitrogênio, sobre o crescimento da cultura primária.	63
II.5	Avaliação do pH do meio MSF de calos friáveis.	71
II.6	Contaminação bacteriana nas suspensões.	76
II.7	Plaqueamento celular e indução de calos.	76
7.1	Influência do ANA e BAP sobre a indução de calos. .	76
7.2	Influência do volume da suspensão celular na indução de microcalos.	77
7.3	Verificação da viabilidade dos microcalos em meio MSP, durante o plaqueamento.	77
7.4.	Efeito do tamanho de placa sobre a indução de microcalos.	78
7.5	Efeito da superfície do meio e concentração de agar sobre a indução de microcalos.	79
7.6	Efeito de diferentes citocininas autoclavadas na indução de microcalos, a partir de inóculos de	

	suspensão celular misturado com meio.	80
7.7	Efeito de diferentes citocininas ultrafiltradas, na indução de microcalos, a partir de inóculos de suspensão celular misturado com o meio.	80
7.8	Efeito de diferentes citocininas ultrafiltradas, sobre a indução de microcalos, a partir de inóculos de suspensão celular aplicada via seringa.	81
7.9	Comparação do efeito sobre o crescimento de calos, entre o método de aplicação por "seringa" e de "mistura" da suspensão celular.	81
II.8	Regeneração	82
8.1	Indução de brotações através da combinação adenina e 2,4-D.	82
8.2	Indução de brotações por transferência de calos para concentrações crescentes de adenina.	82
8.3	Efeito do amido de milho (maizena), no crescimento de brotações.	83
8.4	Efeito do aumento da concentração de açúcar no crescimento das brotações.	84
8.5	Efeito do AgNO_3 sobre a indução de brotações.	85
II.9	Crescimento e bulbificação de plântulas.	85
9.1	Efeito de diferentes níveis de sacarose sobre a bulbificação.	85
9.2	Efeito do ácido indolilbutírico sobre a bulbificação.	86
III	DISCUSSÃO	97
III.1	Dos experimentos preliminares à suspensão celular.	97
III.2	Efeito de vários fatores sobre o crescimento da cultura primária de Chonan.	101
2.1	Efeito da combinação 2,4-D/BAP.	101
2.1.1	- Medição do crescimento da população celular.	108
2.2	Efeito do MES.	109
2.3	Efeito do rifaldin.	112
2.4	Efeito de diferentes fontes de sacarose.	115

2.5 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio.	118
III.3 Dos diferentes plaqueamentos.	123
III.4 Da regeneração.	132
III.5 Da bulbificação.	136
III.6 Avaliação do pH nos meios de calos friáveis.	137
III.7 Contaminação bacteriana.	139
IV CONCLUSÕES	141
RESUMO	143
ABSTRACT	148
REFERÊNCIAS	153
APÊNDICE I	176
APÊNDICE II	183
APÊNDICE III	186
APÊNDICE IV	189
APÊNDICE V	193
APÊNDICE VI	196

INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum* L.) é uma hortaliça cujo consumo no Brasil está bastante difundido, pois tem ocupado o quarto lugar dentre as mais consumidas (Filgueira, 1982).

No país existem diferentes variedades que estão sendo cultivadas ao longo de 13 estados da federação, abrangendo diferentes regiões ecofisiológicas, mas, o país não é autosuficiente e deve importar parte do seu consumo.

Nestes últimos anos as importações chegaram, aproximadamente, a 27% do consumo total (Neto, 1986), mas, espera-se que esse número deva diminuir ainda mais nos próximos anos. Para tanto, o agricultor nacional deverá, aumentar sua produção com a incorporação de melhor tecnologia agrícola e aumento da área cultivada.

Melhor tecnologia agrícola significa, neste caso por exemplo, usar alho semente de boa qualidade e também produtos químicos como: inseticidas, fungicidas e nematicidas. Isto, porque os cultivares nacionais, sejam estes nobres ou comuns, precoces ou tardios, estão expostos à competição com plantas daninhas e são suscetíveis à doenças e pragas, o que pode representar um prejuízo enorme, se estas adversidades de campo se tornarem críticas na fase inicial da cultura.

Entre as plantas daninhas mais comuns e agressivas citam-se: a tiririca, (*Cyperus rotundus* L.), (Mascarenhas, 1986). Entre as doenças citam-se: a ferrugem, (*Puccinia allii*), a mancha púrpura, (*Alternaria porri*), podridão branca, (*Sclerotium cepivorum*), e o nematóide, (*Ditylenchus dipsaci*). Com relação às pragas mencionam-se: o ácaro dos bulbos, (*Aceria sp.*), traças, (*Cadra cautella*), e tripes, (*Thrips tabaci*). Estas moléstias, seriam as principais de importância econômica (Embrapa, 1984). Por outro lado, como o alho se propaga exclusivamente pela via vegetativa, apresenta uma grande disposição para hospedar

vírus, mas, as estirpes e demais características, pelo menos no plano nacional, não estão bem definidas (Carvalho, 1986).

Todavia, existe uma anormalidade de ordem "genético-fisiológico", que é mais frequente em alguns cultivares que em outros, e faz com que estes cultivares nacionais, sejam menos competitivos que o alho importado. Trata-se do pseudoperfilhamento ou superbrotação, anomalia esta que pode ser agravada pelo fotoperíodo inadequado e baixas temperaturas de armazenamento e/ou ciclo vegetativo. O Chonan, apesar de ser um cultivar nobre, portanto de boas características comerciais, apresenta este problema, o qual, reduz sua produtividade e limita sua expansão (Souza & Casali, 1986).

Frente a este elenco de obstáculos e entraves agronômicos, o alho, é uma espécie que não se reproduz sexualmente, portanto, torna-se difícil articular um programa convencional, visando vencer as dificuldades antes mencionadas, assim, o melhoramento genético do alho, tanto no Brasil como em outros países, tem-se tornado difícil e lento. Paralelamente a esta constatação a cultura de tecidos, neste caso, tem despertado interesse, como aliada de programas de melhoramento na expectativa de induzir e detectar variabilidade genética (Novak, 1980).

Dentro deste contexto, a cultura de células em meio líquido, pode representar, *lato sensu*, populações celulares com grande potencial experimental capazes de servir de base a linhas de pesquisas em várias direções, tais como: transformação, auxotrofia, biotransformação, crescimento, metabolismo, etc. (Maliga, 1984).

Entretanto, nesta espécie, em um passo anterior previamente a qualquer iniciativa sobre aplicações da suspensão celular, torna-se indispensável estruturar um protocolo básico sobre crescimento e manutenção de células em meio líquido, capaz de servir de ponto de partida a qualquer uma das variedades nacionais, visando isolar ou identificar variantes ou mutantes no laboratório e no campo.

Dentro de um ponto de vista geral, na cultura de células em meio líquido, podem reconhecer-se vários passos, entre eles: indução de calos friáveis, estabelecimento e manutenção de células em meio líquido, plaqueamento e regeneração.

São desejáveis calos friáveis e/ou embriogênicos (Street, 1977; Vasil & Vasil, 1984), porque estes se desagregam facilmente no meio líquido, fato que não acontece com os não friáveis ou compactos. Por isso, a maioria dos trabalhos nesta área tem usado calos friáveis. Entretanto, a obtenção deste tipo de calo pode não ser fácil, o que dificultará o estabelecimento do sistema (Taira et al., 1977).

A quantidade de inóculo pode variar em função do tamanho do frasco e volume do meio contido nele. Assim, para frascos de 125 ml com 25 ml de meio, tem-se usado entre 500-700 mg (Dodds & Roberts, 1983b). Por outro lado, para frascos de 500 ml com 60 ml de meio, a quantidade variou entre 2,0 - 4,0 g (Smolenskaya et al., 1989).

Os calos deverão permanecer em agitação, 120-150 rpm, tanto para favorecer a desagregação como para facilitar a oxigenação, evitando neste último em particular, o surgimento do efeito Pasteur ou problemas de anaerobioses (Chang et al., 1983; Crawford & Baines, 1977). Com relação à luz, esta poderá estar presente ou não (Esaka et al., 1988). Depois de algum tempo de agitação, o material deve ser peneirado (100, 300 ou 500 um de diâmetro de malha) para retirar os agregados maiores e ficar com maior proporção de células livres e agregados menores, que deverão ser transferidos para o estabelecimento da suspensão em meio líquido.

Com respeito à quantidade de inóculo a transferir, tipo de frascos, meio, balanço hormonal, etc., a utilizar, estes tem sido variados e na tabela 1, alguns exemplos são apresentados.

Tabela 1. Algumas características relacionadas com o procedimento da cultura de células em meio líquido.

	Referência *				
	1	2	3	4	5
Meio	B5	LS	MS	B5	MS
Hormônio mg/l	2,4-D (1,1)	2,4-D-KIN (0,4-0,03)	2,4-D-ZEA (1,5-0,5)	2,4-D-KIN (1,0-0,09)	2,4-D (2,0)
Açúcar (%)	sacarose (2)	sacarose (3)	sacarose (3)	sacarose (2)	sacarose (2)
Luz	sim	não	não	não	não
Temperatura (C)	28	25	25	26	27
Agitação (rpm)	150	120	120	120	150
Erlenmayer (ml)	250	250	250	1000	125
Quantidade de meio (ml)	50	40	50	300	16
Quantidade de suspensão: a (ml) ou b (g)	10a	10a	25a	26b	12a
Transferências (dias)	4-5	4	14	7	7
Espécie	<i>P. anisum</i>	<i>N. sylvestris</i>	<i>O. sativa</i>	<i>S. californica</i>	<i>T. aestivum</i>

* Referências

1) Huber et al., 1978. 2) White & Vasil, 1979. 3) Landry & Smyth, 1988. 4) Marques & Brodelius, 1988. 5) Vasil et al., 1990.

Sob estas condições, se representado graficamente o aumento do número de células ou matéria seca das mesmas, em função do tempo, obter-se-á uma curva sigmóide, Fig.1.

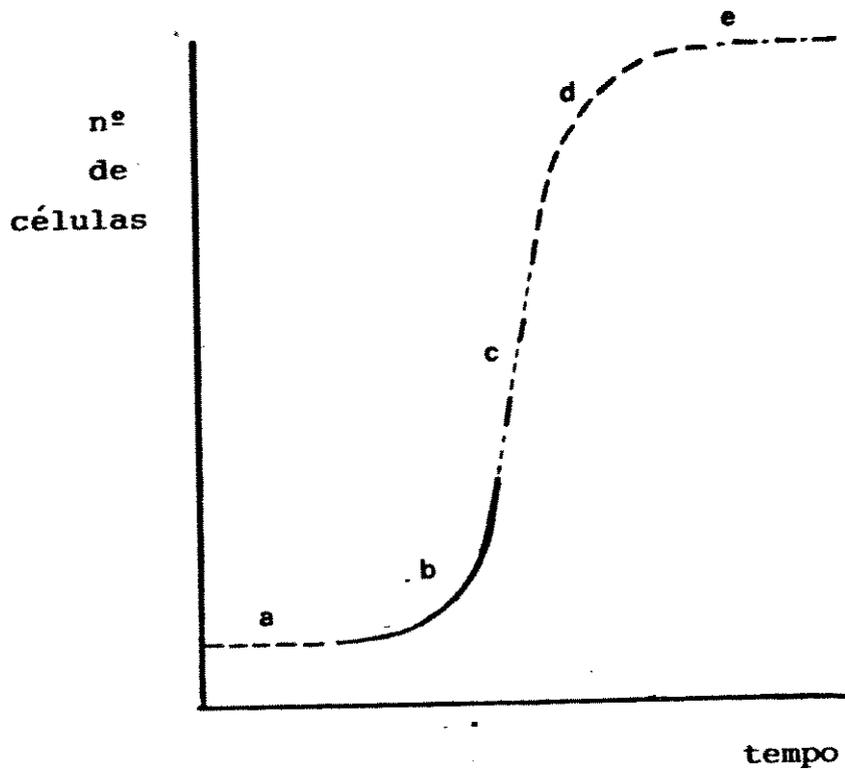


Fig. 1. Curva de crescimento modelo, de uma suspensão celular, mostrando suas diferentes fases. a: fase "lag"; b: fase exponencial; c: fase linear; d: fase de progressiva desaceleração; e: fase estacionária, (King et al., 1972).

Esta curva é típica de organismos vivos e tem sido constatada tanto em procariontes como em eucariontes (Palleroni, 1970; Serrero-Davé, 1984) e tem contribuído bastante à compreensão dos fatores envolvidos no crescimento. Nela e no tocante a plantas, alguns autores (Bidwell, 1979c; Salisbury & Ross, 1985c) distinguem 3 fases: uma exponencial, outra linear e uma de senescência. Na primeira (a), o crescimento é lento no começo, porém, depois rápido e de incrementos contínuos (b). Na fase linear (c), o valor dos incrementos é constante,

não muda. Na senescência (d) o crescimento vai progressivamente desacelerando, até manter-se num patamar estacionário (e).

A fase exponencial também é chamada de logarítmica pelo fato de que resulta uma reta quando o crescimento é expresso pelo logaritmo de células através do tempo. Esta fase é o período no qual a duplicação das células se produz com máxima velocidade sob as condições experimentais (Palleroni, 1970). Entretanto, podem existir variações referentes a velocidade e duração de cada uma das fases em se tratando de espécies ou condições experimentais diferentes de avaliação ou de estudo (Bidwell, 1979c).

O crescimento populacional de uma cultura em dois momentos dados, pode ser expresso também pela equação: $N_2 = N_1 2^g$ (Jawetz et al., 1968), que pode ser transformada para:

$$g = \frac{\log N_2 - \log N_1}{\log 2}$$

onde, N representa o número de células em dois instantes diferentes da cultura, e g, o número de gerações. A equação é importante porque permite calcular g de uma maneira simples e rápida, coisa que não é possível sob condições experimentais diretas, além do mais, pode-se calcular o tempo de duração de cada geração (Manford & Patterson, 1979).

Para suspensão celular de alho, ainda não se têm valores a este respeito, bem como, para taxas de crescimento relativo (TCR), (Leopold & Kriedemann, 1975), conforme a equação:

$$TCR = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1},$$

Estas taxas expressam os incrementos ao longo da fase exponencial em função de uma densidade populacional pré-existente (W_1) num período definido de tempo. Esta equação, não é senão a derivação de outra usada para expressar o aumento de capital sob um regime de juros

composto e que por analogia tem-se usado também para a avaliação do crescimento vegetal. A analogia reside no fato que em ambos os casos, capital e células, os incrementos adicionam-se continuamente à massa inicial. A equação em questão é $W_2 = W_1 e^{rt}$, (Bidwell, 1979c), onde r representa a taxa de crescimento da população ou do capital ao longo do tempo, e W , a matéria seca ou fresca, ou mesmo, o capital.

Com respeito à curva de crescimento, o monitoramento poderá ser feito via contagem de células ou pesagem das mesmas (Dodds & Roberts, 1983e), mas, ambos os métodos oferecem a dificuldade de serem demorados e pouco práticos, sendo assim, outras alternativas devem ser encontradas. Contudo, valores de $2,0 \times 10^6$ células/ml e 11 mg células/ml (peso seco) tem sido reportados respectivamente para a fase exponencial (Smolenskaja et al., 1989; Landry & Smyth, 1988), valores altos sem dúvida, por isso esta fase é de maior interesse, porque é capaz de fornecer um alto número de células em divisão com um grande potencial genético e de manipulação.

Durante a vida das células em meio líquido, podem acontecer alterações genéticas espontâneas cuja frequência pode oscilar entre 10^{-6} a 10^{-10} (Mantell et al., 1985). Se algumas destas mutações não são letais, as células se dividirão igual às normais, aumentando sua porcentagem na população. Esta heterogeneidade genética pode ser útil para uma espécie como o alho, onde não existe possibilidade de recombinação gênica natural, porque pode representar variabilidade.

Esta variação natural, denomina-se variação somaclonal (Evans et al., 1984) e suas causas, embora muitas a nível cromossômico, não estão bem definidas (Larkin & Scowcroft, 1981). Esta variação tem sido explorada com grande vantagem em cana, fumo, batata, arroz e milho, na forma de caliclones ou protoclonos (Chaleff, 1983). No país, recentemente caliclones de alho, mas, não de suspensão celular, tem sido relatados. Nesses variantes, uma redução no número de bulbilhos por bulbo foi observada (Illg, 1990). Como este material, tem mantido esta característica durante 2 ciclos no campo, tudo sugere tratar-se de uma

característica nova e não de uma variação epigenética.

A grande amplitude da variação cromossômica sob condições *in vitro*, foi discutida por Sunderland, (1977), e mais recentemente por Lee & Phillip, (1988). Ambos autores atribuem importância a esta variação, entretanto esta, nem sempre tem-se refletido fenotipicamente ou positivamente nas plantas regeneradas. Por esta razão, os estudos a este respeito tem continuado, visando aumentar esta variabilidade fenotípica mediante o uso de mutagênicos químicos, através do aumento da frequência de mutações para um valor 10^{-3} ou perto dele (Maliga, 1984).

Os mutagênicos químicos levam vantagem sobre os físicos (raios x ou gama) porque produzem alterações cromossômicas mais localizadas ou pontuais, e por isso mesmo, menor dano cromossômico, além do mais, podem ser usados no próprio laboratório, em troca, oferecem riscos de manipulação, pois podem ser cancerígenos (Neto et al., 1990). Alguns destes agentes químicos usados para a indução de mutações em suspensão celular tem sido: metanosulfonato de etila, (EMS) Carlson, 1973; N-metil-N nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG, ou, NG) King, 1984; e, N-etil-N- nitrosourea (NEU) Marton et al., 1982.

O terceiro passo na sequência de eventos da cultura de células em meio líquido, é o plaqueamento. Para tanto, células em fase exponencial deverão ser plaqueadas. Para isso, um volume x (2 ml) de suspensão celular é misturado a outro volume y (10 ml) de meio morno + ágar, em seguida a mistura resultante é distribuída em placas petri, (90 mm de diâmetro), as quais podem ficar a 25°C no escuro, (Street, 1977).

Em outra alternativa, o meio + ágar quente (25 ml), é distribuído nas placas de Petri (100 x 20 ml). Espera-se solidificar e distribui-se uma alíquota de suspensão (1 ml) na superfície. As placas são mantidas a 30°C no escuro (Meredith, 1978). Uma variante, deste procedimento é a inclusão de papel filtro na superfície do meio + agar, de modo que as células sejam depositadas sobre o proprio papel (Horsch & King, 1980).

Em ambas formas de plaqueamento, após algum tempo, 3 a 4 semanas, os microcalos começam a tornar-se visíveis. No caso de estar procurando somaclones, os mesmos deverão ser removidos e transferidos para um meio de regeneração, para proceder as observações e avaliações quanto a seus respectivos caracteres tais como: altura da planta, forma de folha, fertilidade, poliploidia, resistência, etc, (Skirvin & Janick, 1976; Dyer et al., 1988).

O meio de plaqueamento deveria possuir um agente seletivo na eventualidade de estar-se procurando variantes ou mutantes, consequência da aplicação de um mutagênico químico, no meio líquido. De acordo com Maliga, (1984), existem duas maneiras de se fazer isto. Na primeira, as células são plaqueadas em meio com um agente seletivo, tal como: toxina, metal pesado, herbicida, etc. Neste caso, as células normais seriam as mais atingidas enquanto aquelas que experimentaram uma mudança fenotípica compatível com a pressão de seleção aplicada seriam menos atingidas. No alho, em geral, este procedimento poderia ser aplicado para isolar variantes ou mutantes para obter-se resistência.

Na segunda alternativa, o meio possui um análogo de bases nitrogenadas ou de amino ácidos, tais como: o 5-bromodesoxiuridina, BUdR, (Márton & Maliga, 1975), ou, 5-metil DL-triptofano, 5MT, (Widholm, 1977) respectivamente. Neste caso, as células normais, devido a sua maior taxa metabólica são eliminadas ou mortas, em consequência de sua maior incorporação de metabólitos, enquanto que, às variantes ou mutantes, pouco ou nada deveriam lhes acontecer nesse meio mínimo, em função da não incorporação desses análogos, pois, são deficientes de alguma rota metabólica (mutantes auxotróficos). Para alho, este procedimento poderia ser usado nos programas de melhoramento que contemplem a hibridação somática, o que seria uma forma de recuperar as células fusionadas.

Contudo em ambos os casos, os resultados deveriam ser tomados com uma certa dose de cautela, porque agentes mutagênicos químicos

também podem induzir câmbios epigenéticos (Meins, 1983), sendo assim, testes adicionais deveriam ser feitos, inclusive, chegando a determinar o caráter dominante ou recessivo da mutação e no caso do alho, através de vários ciclos no campo.

Infelizmente pelo fato do alho carecer de uma estrutura floral normal, a obtenção de haplóides para trabalhos de variabilidade em suspensão celular não é possível, entretanto, mesmo que o fosse, as dificuldades não seriam pequenas devido à tendência destas células a diploidizar espontaneamente mascarando resultados (Sacristan, 1971; Koornneef et al., 1989).

Com respeito às condições *in vitro* do plaqueamento tais como: meio nutritivo, hormônios, luz, temperatura, etc., não são diferentes das características apresentadas na tabela 1 para esses itens, assim os meios utilizados podem ser: MS, B5, ou LS e os hormônios 2,4-D, 2iP, KIN, etc., na presença de luz ou no escuro e tanto na suspensão como no plaqueamento a preocupação com a densidade do inóculo inicial não deve ser subestimada, para que se evite o insucesso dos resultados. De acordo com Horsch, 1984, no plaqueamento, este inóculo deve estar na casa de 10^3 a 10^4 células ou pequenos agregados por ml.

Em geral, a literatura referente ao plaqueamento é encontrada em uma percentagem bem menor do que da literatura sobre suspensão celular. A maior percentagem desta última literatura, tem sido relacionada com a cultura de células em meio líquido propriamente dito, por exemplo, para estudar: pH (Martin & Rose, 1976), ciclo celular (Nishinari & Syono, 1986), enzimas (Li et al., 1990), elicitor (Dalkin et al., 1990), criopreservação (Kobayashi et al., 1990), nutrientes (Seresinhe & Oertli, 1991) e fitopatologia (Binarová et al., 1990). É provável que esta pouca frequência de trabalhos sobre plaqueamento esteja relacionada com a formação de agregados de células em meio líquido, portanto, com risco de mixoploidia por um lado (Negrutiu et al., 1984), bem como, com a dificuldade de expressar numericamente a eficiência de plaqueamento, ou ainda talvez pela dificuldade de separar

adequadamente os agregados celulares e quantificar o número de células, devido a que a eficiência do plaqueamento leva esta variável incluída na sua fórmula. Assim, a eficiência de plaqueamento é definida como:

$$EP = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias visíveis}}{\text{n}^\circ \text{ de células inoculadas}} 100, \text{ (Street, 1977).}$$

Entretanto, o conceito de eficiência ultimamente não tem sido incluído em trabalhos de transformação com suspensão celular e plaqueamento para a obtenção e isolamento de transformantes. (Gordon-Kamm et al., 1990; Spencer et al., 1990). Tudo isto, sugere uma espécie de reivindicação da suspensão celular, já que por muito tempo trabalhos sobre plaqueamento não tinham sido encontrados com facilidade na literatura, e muito menos regeneração a partir desta, devido ao fato de que a maior parte deles relacionam-se com mutagênese ou seleção a nível de calo, tão somente (Meredith, 1978; Colijn et al., 1979; Weber & Lark, 1979). Isto contrasta fortemente com a literatura de protoplastos, onde tem-se observado que a problemática do plaqueamento e regeneração está mais presente (Carlson, 1973; Lu et al., 1981; Tavazza & Ancora, 1986; Bellini et al., 1990). Apesar das aparentes restrições no uso da suspensão celular com relação ao plaqueamento e conseqüentemente com a regeneração, a cultura de células em meio líquido, tem sido usada na obtenção de protoplastos e regeneração em cereais (Vasil et al., 1983; Vasil et al., 1990), grupo botânico este, que tem oferecido bastante resistência à regeneração de protoplastos via mesofilo, (Evans et al., 1980; Vasil, 1982).

Finalmente, não se poderia deixar de se mencionar no uso da cultura de células em meio líquido, à engenharia genética tentando melhorar o alho. Mas, para o alho ainda é muito cedo para se pensar numa saída como esta, porque no momento, não existe uma massa crítica de informação em relação a células em meio líquido, vetores, mapeamentos, identificação gênica e promotores, para compor o "quebra-cabeça" da transformação gênica (Gatenby, 1983; Old & Primrose, 1986).

Na presente introdução, tentou-se apresentar um panorama

suscinto e geral sobre: problemas do alho no campo, factibilidade técnica da metodologia da cultura de células e de seu potencial como instrumento para induzir e detectar variabilidade, visando alcançar novas possibilidades de melhoramento para a espécie dentro do contexto da agricultura regional ou nacional.

Com base nos antecedentes apresentados, o presente trabalho, tem como objetivo principal o de estruturar um protocolo de uma suspensão celular de alho cv. Chonan. Para tanto, propõe-se que esse objetivo seja alcançado através das seguintes metas.

- 1.- Estabelecer uma linha de calos friáveis.
- 2.- Estabelecer e manter células em meio líquido.
- 3.- Plaquear, induzir e promover a formação de calos.
- 4.- Regenerar plantas e bulbificá-las.

Em relação a estas metas, diversos experimentos serão realizados visando otimizar seus resultados.

Espera-se que os resultados obtidos forneçam informações para o direcionamento e viabilização das próximas etapas nas pesquisas do melhoramento do alho.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste item, se descrevem as atividades concernentes a alho (*Allium sativum L.*) e que estão relacionadas com:

- I.1 - Descrição do material vegetal.
- I.2 - Assepsia de explantes.
- I.3 - Estabelecimento e manutenção de células em meio líquido.
- I.4 - Plaqueamento celular e indução de calos.
- I.5 - Regeneração de plântulas.
- I.6 - Crescimento e bulbificação das plântulas.

I.1 - Descrição do material vegetal.

Chonan e Branco Mineiro, são dois cultivares da espécie *Allium sativum* L., pertencentes à coleção de alho que vem sendo propagada sob condições "in vitro" no laboratório e que foram procedentes do germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas, e cedidos pelo pesquisador do mesmo Instituto, Sr. Walter Siqueira.

Estes cultivares apresentam diferenças agronômicas quanto ao número de bulbilhos: mais de 20 em Branco Mineiro e até 20 em Chonan, sendo que este último, é mais exigente em frio que o primeiro e por isso mesmo, mais propício para o plantio nos estados do sul que nos estados da regiões Sudeste ou Centro-Oeste (EMBRAPA, 1984).

Entretanto, por carecer de alho "in natura" do cultivar Chonan, por ocasião do início da parte experimental da presente tese, os trabalhos foram iniciados não incluindo o cultivar Chonan. Assim, unicamente Branco Mineiro foi usado no item 1.2., porém, ambos cultivares foram usados nos itens: 1.3.0, 1.3.2 e 1.3.4, mas, a partir do item 1.3.5. em diante, foi usado apenas Chonan.

I.2 - Assepsia do explante.

Experimento 1.0

Foram usados bulbilhos do cultivar **Branco Mineiro**, os quais, foram descascados e desprovidos do seu opérculo basal, logo, lavados em água de torneira e sabão líquido. A seguir, foram distribuídos 48 bulbilhos em 3 frascos erlenmeyers contendo hipoclorito de Na (marca comercial Qboa) 50%. Cada frasco foi mantido em agitador mecânico por 30, 45 e 60 minutos. Depois disso, os bulbilhos foram várias vezes lavados com água esterilizada e desmineralizada na câmara de fluxo laminar, e a seguir, inoculados em frascos esterilizados (120°C por 20 minutos) contendo um pequeno chumaço de algodão umedecido com 8 ml de água destilada. Os frascos contendo um bulbilho cada, ficaram em

presença de luz, aproximadamente $50 \text{ uE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h, e temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ durante uma semana. Estas condições de luz e temperatura foram padronizadas e a menos que se indique outra coisa deverão subentender-se nos próximos experimentos.

Experimento 1.2

Os bulbilhos não contaminados correspondentes aos 3 tratamentos (30, 45 e 60 minutos), foram dissecados em câmara de fluxo laminar e os explantes inoculados em meio **MS** (Murashige & Skoog 1962) suplementados com 200 mg/l de Benlate (50 % de princípio ativo Benamil) mais carvão ativado (0,1 %). Estes últimos adicionados ao meio após aferir o pH e corrigi-lo para 5,8 com KOH 1 normal (N).

Os explantes utilizados foram: disco caulinar (colo), porção basal da folha externa, porção basal da folha interna e ápices de raízes. Foram usados 10 frascos por tratamento, contendo um explante cada um. Os frascos ficaram no escuro à temperatura do laboratório. Aos 7 e 15 dias, foi avaliada a presença ou não de fungos.

Experimento 1.3

Após 15 dias, na câmara de fluxo laminar, os explantes foram transferidos para meio **MS** suplementado com 100 mg/l de 2,4-D e 0,1 % de carvão ativo. Foram usados 10 frascos por tipo de explante, proveniente de cada um dos tratamentos anteriores. Para folha externa e interna, bem como para raízes, foram usados 3 explantes por frasco, enquanto para colo, um. Os frascos ficaram sob as mesmas condições ambientais de 1.2 e aos 10 dias, foi feita uma avaliação sobre a contaminação.

Experimento 1.4

Frascos contendo meio MS acrescido de Benlate: 0,0, 100 e 200 mg/l, foram inoculados com aproximadamente 1 cm de diâmetro de micélio de *Fusarium* proveniente de frascos contaminados do experimento anterior. Foram usados 10 frascos por tratamento, os quais, ficaram sob as mesmas condições ambientais que 1.3, durante 10 dias.

I.3.0 - Estabelecimento e manutenção de células em meio líquido.

I.3.1 - Experimentos preliminares.

I.3.2 - Regeneração de plântulas a partir de calos envelhecidos de Branco Mineiro e Chonan (BM, Ch).

Calos dos cultivares BM e Ch mantidos por cerca de 5 anos em meio de cultura no laboratório, foram usados neste experimento. Os calos apresentavam-se clorofiláceos, compactos e vigorosos. Tendo como base o meio MS e diferentes níveis de adenina: 0,0, 20,0 e 40,0 mg/l, 25 frascos foram inoculados por tratamento, tendo colocado 1 calo por frasco. Aos 30 dias, os calos que estavam nos tratamentos com adenina, foram transferidos para o mesmo meio, porém, carente da mesma. Os calos controles, também foram repicados. Após 90 dias os tratamentos foram avaliados.

I.3.3 - Indução de calos a partir de brotações regeneradas "in vitro" de BM e Ch.

Experimento 2.

Brotações provenientes de BM e Ch do experimento anterior, foram utilizadas como explantes. Estes foram de 2 tipos. Um, constituído apenas pela lâmina foliar da brotação e o outro, pela parte basal envelhada das mesmas. O tamanho dos explantes foi de 1 cm

aproximadamente, e foram colocados 5 explantes por frasco, sendo que foram repicados uma vez durante o período de manutenção. Foi usado meio MS, mais (mg/l): 3,6 de picloran, 1,1 de 2,4-D e 2,1 KIN.

I.3.4 - Obtenção de calos aclorofiláceos friáveis mediante 2,4-D. Experimento 4.

Calos clorofiláceos, compactos e saudáveis embora envelhecidos, foram usados neste experimento. Foi usado meio MS modificado com 3 níveis de 2,4-D, os quais foram (mg/l): 0,0, 0,5 e 1,0. Foi colocado 1 calo por frasco, aproximadamente de 1 cm de diâmetro, num total de 20 frascos por tratamento. Os calos aos 30 e 60 dias foram avaliados em relação à persistência visual de clorofila. Transcorrido esse tempo, os frascos com 1,0 mg/l de 2,4-D foram mantidos em meio MS modificado e repicados a cada 60 dias. A denominação deste meio doravante será de MSF e sua composição foi:

Sais:

Macros

Micros

Vitaminas:

Pantotenato de Ca 1mg/l.

Piridoxina. HCl 1mg/l.

Tiamina. HCl 1mg/l.

Ac nicotínico 1mg/l.

Orgânicos:

Inositol 100 mg/l.

Sacarose não PA prefiltrada 30 g/l.

Caseína hidrolizada 250 mg/l.

Ágar Ciolga 7,5 g/l.

Hormônios:

2,4-D 1 mg/l.

pH: 5.8 ajustado com KOH 1 N.

Autoclave: 120°C, 1 atmosfera, por 20 minutos.

I.3.5 - Indução da suspensão celular em meio líquido: cultura primária. Experimento 1.

I.3.5.1 - Composição do meio líquido

Em câmara de fluxo laminar, aproximadamente 5 a 7 g de calos friáveis do cv. *Chonan*, foram colocados em erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml de MS modificado cuja composição foi:

Sais:

Macros, mas, $\text{NH}_4\text{NO}_3/3$.

Micros, mas, Fe-EDTA/2.

Vitaminas:

Pantotenato de Ca 3mg/l.

Piridoxina - HCl 3mg/l.

Tiamina - HCl 3mg/l.

Ac nicotínico 3mg/l.

Orgânicos:

Inositol 100 mg/l.

Sacarose PA 20 g/l.

L-Glutamina 146 mg/l.

Hormônios:

2,4-D 0,5 mg/l.

BAP 0,5 mg/l.

pH: 5.8 ajustado com KOH 1 N.

Autoclave: 120°C, 1 atmosfera, por 20 minutos.

O meio foi preparado da seguinte maneira. Prévio ajuste do pH a solução contendo: macros, micros, inositol e sacarose, foi autoclavada, depois, na câmara de fluxo laminar, as vitaminas, a glutamina e os hormônios filtrados através da membrana de acetato de celulose Sartorius, 0.22 um de diâmetro de poro, foram adicionados em frio à parte já autoclavada do meio. Normalmente, o meio ficava 48 h à temperatura do laboratório e depois, guardado em geladeira. Nesta fase, a composição do meio será constante e receberá a denominação de BC.

I.3.5.2 - Preparação do inóculo

Os frascos erlenmeyers inoculados com meio BC, foram posteriormente colocados em agitador mecânico (120 r.p.m.) à temperatura de laboratório e sem luz durante uma semana. Cumprido este tempo, o material foi peneirado na câmara de fluxo laminar. Para tanto, peneiras plásticas (autoclaváveis) de 800 um de malha foram usadas. Cada filtrado, foi recebido em um copo de vidro de 200 ml, e o resíduo da peneira eliminado. A fina suspensão celular recebida em cada copo, foi transferida para cada um de 12 frascos de 250 ml, (frascos matrizes). Logo, esperava-se decantar, e depois renovava-se, aproximadamente 80% do meio por meio fresco BC. Nestas condições, os 12 erlenmeyers voltavam novamente para o agitador, onde ficaram 15 dias, mas, sempre renovando-se o meio da suspensão 2 vezes por semana. Para isso, 40% do meio era trocado por meio novo. Para tanto, deixava-se sedimentar as células por um momento e depois, vertiam-se 20 ml dos frascos num beaker cujo conteúdo era eliminado depois. Durante a manipulação na câmara de fluxo laminar, todo o material em contato com a suspensão foi esterelizado, e esta providência deverá subentender-se em todos os próximos experimentos.

I.3.6 - Curvas de crescimento: efeito de diferentes combinações de 2,4-D e BAP.

Em geral foi utilizado um frasco matriz para 2 de tratamento, isto é, cada tratamento recebeu de seu respectivo frasco matriz 10 ml de suspensão, por isso, aos 15 dias, de cada um dos 12 frascos matrizes foram retirados 20 ml de inóculo de suspensão celular, mediante seringa de mola, e transferidos para 2 erlenmeyers (10 ml cada) de 250 ml contendo cada um deles, 40 ml de meio BC novo, fazendo um volume total de 50 ml.

Nesta fase, o meio BC foi suplementado com diferentes combinações de 2,4-D e BAP, os quais, foram:

<u>2,4-D (mg/l)</u>	<u>BAP (mg/l)</u>
0,0	0,0
0,5	0,0
0,0	0,5
0,5	0,5
1,0	0,5
2,0	0,5

Para cada tratamento, foram usados 4 repetições. Uma vez inoculados os frascos, estes foram colocados no agitador, sob, temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sem luz.

Com relação à avaliação do crescimento celular, os incrementos de densidade populacional das células foram registrados através do diâmetro do sedimento no interior dos frascos, medido externamente com régua comum, duas vezes por semana, por ocasião da renovação de 40% do meio. Em cada frasco, se faziam 3 medições do sedimento celular. Também, o pH dos meios foi medido, o qual, foi feito na oportunidade de renovação dos meios. O período de avaliação durou 5 a 6 semanas.

I.3.6.1 - Pesagem do inóculo.

Mediante filtração ao vácuo na câmara de fluxo laminar, 10 ml de cada um de 5 frascos matrizes contendo suspensão remanescente (30 ml), foi coletado material celular em papel filtro de 10 ml de diâmetro, previamente pesado e seco na estufa, a seguir, através de placas de Petri o papel filtro, foi mantido por 24 h em estufa a 50°C. Depois deste período, as placas foram mantidas aproximadamente 30 minutos em dessecador contendo sílica gel. Logo, o papel com a matéria seca foi pesado.

Com respeito à metodologia descrita em I.3.5.1, I.3.5.2, I.3.6. e I.3.6.1 deverão considerar-se padronizadas e deve subentender-se nos próximos experimentos.

Com relação à análise estatística, as combinações de 2,4-D/BAP (mg/l) foram desdobradas em duas análises. Na primeira, os tratamentos foram: 0,0/0,0; 0,5/0,0 e 0,5/0,5. Na segunda: 0,5/0,5; 1,0/0,5 e 2,0/0,5. Cada tratamento possuía 4 repetições e o maior ou menor efeito dos mesmos, foi avaliado cada 7 dias durante 5 semanas, sendo que a significância das médias foi analisada pelo teste de Tuckey a 5%. Cabe mencionar que este último delineamento experimental, (duas variáveis), será usado como base nos próximos 4 experimentos.

I.3.7 - Efeito do MES no crescimento da cultura primária.

Experimento 2.

Foram usados 3 níveis de MES, os quais foram (g/l): 0,0, 0,5 e 1,0. O tampão, foi adicionado ao meio após aferir o pH em 5,8 e este, novamente checado antes de autoclavar o componente salino do meio BC. Depois, este quando frio, foram-lhe adicionados as vitaminas e hormônios correspondentes, previamente ultrafiltrados através de membrana de acetato de celulose Sartorius, na câmara de fluxo laminar.

Correspondendo aos 3 tratamentos, foram preparados 12 frascos contendo cada um 40 ml de meio BC, mais 10 ml de suspensão celular em fase exponencial de crescimento, anteriormente já preparadas, segundo descrito em I.3.5.2 e I.3.6. Os Frascos ficaram em agitação sem luz e temperatura de laboratório durante 4 semanas, período durante o qual, foram monitorados quanto a: crescimento da suspensão, variação de pH e renovação do meio. Aliquotas de 10 ml foram também retiradas do meio remanescente dos frascos matrizes, para determinar a quantidade de matéria seca existente naquele volume de suspensão.

I.3.8 - Efeito do rifaldin no crescimento da cultura primária. Experimento 3.0.

Foram usados 4 níveis do antibiótico rifaldin (rifampicina), os quais foram (mg/l): 0,0, 5,0 10,0 e 20. Prévia esterilização por membranas de acetato de celulose Sartorius, estas concentrações foram adicionadas, na câmara de fluxo laminar, a seus respectivos meios estoques BC. Para os 4 tratamentos foram preparados 16 frascos, contendo 50 ml de suspensão cada um. Finalmente os frascos foram colocados em agitação e mantidos sob condições de laboratório durante 4 semanas, período durante o qual foram monitorados.

I.3.9 - Comparação do efeito entre sacarose PA e sacarose comercial, sobre o crescimento da cultura primária. Experimento 3.0.

Ambos tipos de sacarose, foram usadas numa única concentração de 20 g/l, porém, a sacarose não PA foi filtrada em papel (Whatman) antes de ser adicionada a seu correspondente meio BC. Correspondendo aos 2 tratamentos, foram usados um total de 8 frascos erlenmeyers, contendo cada um, um volume final de 50 ml de suspensão. De resto, foi procedido como nos casos anteriores nesta fase do experimento.

I.3.10 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio, sobre o crescimento da cultura primária.

Experimento 4.

As fontes usadas foram (mg/l): L-glutamina (146), KNO_3 (1900), NH_4NO_3 (1650), $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ (1900-1650) e controle, sendo que este último, esteve constituído simplesmente pelo meio BC completo, item I.3.5.

Com relação ao primeiro tratamento, o meio BC tinha como única fonte de nitrogênio a L-glutamina. O segundo, KNO_3 , o terceiro, NH_4NO_3 e o quarto, $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$. Correspondente aos 5 tratamentos, foram, usados 20 frascos, contendo cada um, um volume final de 50 ml de líquido. Em relação ao monitoramento, os passos seguintes, foram similares aos dos experimentos anteriores.

I.3.11 - Avaliação do pH do meio de calos friáveis.

Calos friáveis que vinham sendo repicados em meio MSF, por um período de um ano aproximadamente e que serviam de estoques para fazer suspensão celular, apresentavam 2 matizes de cores: uma amarela clara, e outra, amarela bege.

Por ocasião de uma das repicagens periódicas, a cada 60 dias aproximadamente, se mediu o pH do meio de 40 frascos, 20 de cada, antes mesmo de serem descartados. O pH, foi medido por introdução direta do eletrodo do pHmêtro no meio. Entretanto, os calos repicados ficaram sob as mesmas condições de luz e temperatura. Os dados foram ordenados em classes e representados num gráfico frequência de calos vs pontos médios dos pHs (Vieira, 1981).

I.3.12 - Contaminação bacteriana nas suspensões celulares.

A observação bacteriana, foi realizada com e sem auxílio de corantes. Para tanto, dos frascos apresentando contaminação, foram retirados, mediante pipeta Pasteur, pequenas alíquotas que foram transferidas para frascos erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio BC.

Inoculados aos frascos, estes foram selados e colocados no agitador a $26^{\circ} \pm 2$ C e sem luz.

Após 24 h, amostras foram retiradas para sua observação sob microscópio, sendo que, algumas observações foram feitas sem corantes (400 x) e outras através da coloração Gram. Com respeito a esta última, o procedimento foi o seguinte.

1. Fixação do material.

a) Sobre uma lâmina de vidro, foi espalhado uma pequena gota de meio líquido contaminado.

b) O líquido foi seco, através de passagens rápidas pela chama de uma lamparina.

2. Coloração Gram.

a) Violeta de Genciana, 4,0% foi aplicada diretamente sobre o esfregaço durante 1 minuto, o excesso foi retirado com água de torneira, mas, evitando o impacto direto do jato de água sobre o esfregaço.

b) A seguir, foi aplicado lugol, cujo excesso, após 1 minuto foi eliminado com álcool etílico/acetona, PA, na proporção 50/50.

c) Finalmente, foi aplicado Fuccina básica 0,3%, por 30 segundos, e o esfregaço, lavado com água de torneira igual que em 2a.

d) Secas as lâminas à temperatura ambiente, estas foram observadas com imersão no microscópio.

I.4.0 - Plaqueamento celular e indução de calos.

I.4.1 - Influência do ANA e BAP sobre a indução de calos.

Experimento 1.

Foi usado meio MS cuja composição foi:

Sais:

Macros

Micros e Fe-EDTA/2

Vitaminas:

As do meio BC, no mesmo volume e concentração, porém, autoclavadas.

Orgânicos:

Inositol	100 mg/l.
Sacarose	20 g/l.
Caseína hidrolisada	500 mg/l.
Difco Agar	5,6 g/l.

Ajuste de pH: 5,8 com K OH 1 normal.

Autoclave: 120°C, 1 atmosfera, por 20 minutos.

Balanço hormonal:

<u>ANA</u>	<u>(mg/l)</u>	<u>BAP</u>	<u>(mg/l)</u>
0,0		0,0	
0,0		0,5	
1,0		0,0	
1,0		0,5	

1,0	1,0
1,0	2,0

Foram usados 5 placas de Petri (10 mm x 100 mm) por tratamento, sendo que em cada uma delas, na câmara de fluxo laminar, foram adicionados 30 ml de meio ainda quente. As placas, foram logo tampadas, seladas com plástico PVC e deixadas a temperatura ambiente de laboratório. Verificada a ausência de contaminação às 48 h, às mesmas despejou-se, mediante seringa de mola, 2 ml de suspensão celular, previamente preparadas, conforme já descrito em I.3.5.2 e I.3.6 A seguir, fachadas e seladas as placas foram colocadas sobre prateleiras sob condições de laboratório por 45 dias. O meio usado no plaqueamento, foi denominado por **MSP**.

De forma *ad-hoc* ao experimento anterior, foram usadas 5 placas de Petri, mas, tendo apenas adenina, (10 mg/l), como regulador de crescimento e uma camada de papel filtro estéril sobre o meio. Tanto o meio utilizado quanto o volume da suspensão aplicado foi o mesmo que no caso anterior. Mas neste, a suspensão celular foi despejada sobre a camada de papel. As condições ambientais e tempo de avaliação foram iguais às placas anteriores.

A avaliação da formação de calos foi feita do seguinte modo. Um pequeno papel branco de 55 mm x 40 mm, contendo um orifício de 1 cm² no centro, foi colocado na superfície das placas, sem abrí-las, assim sendo, sob lupa (10x) foram contados os micros calos presentes em cada um dos 4 quadrantes das placas. Em cada quadrante, foi contado aleatoriamente 1 campo.

I.4.2 - Influência do volume de suspensão celular na indução de calos. Experimento 2.

Como de praxe, primeiramente, foram preparados os frascos possuindo a suspensão celular em fase exponencial. Em segundo lugar,

foram preparados 3 frascos de 250 ml contendo 100, 110 e 115 ml de meio **MSP**, aos quais se adicionou, estando ainda mornos, (45°C aproximadamente), 20, 10 e 5 ml de suspensão celular configurando um volume final de 120 ml em cada um deles. A seguir, os frascos foram levemente agitados e seu conteúdo vertido em placas de Petri (10 mm x 100 mm). O meio **MSP** foi suplementado com (mg/l): 1,0 ANA e 0,5 de BAP, e nos próximos plaqueamentos este balanço hormonal deverá subentender-se.

Foram usadas 4 placas por tratamento, sendo que, em cada uma delas colocaram-se 30 ml de meio. Com respeito às condições de luz, temperatura e avaliação, já foram estabelecidas no experimento anterior.

I.4.2.1 - Verificação da viabilidade dos microcalos em meio MSP durante o plaqueamento.

Dez amostras de microcalos (1 a 3 mm de diâmetro) que cresceram no fundo das placas dos tratamentos do experimento anterior, foram isoladas, lavadas com água esterilizada e cuidadosamente colocadas em placas de Petri (10 mm x 45 mm), contendo 2 gotas de água esterilizada. Logo, foi aplicada uma gota de azul de tripano (0,1 %) e observadas à lupa (10 x) depois de 5 minutos. Foram lidos 3 campos por placa. Como controle, foram usados microcalos que tinham sido previamente expostos a álcool 95% por 15 minutos.

I.4.3 - Efeito do tamanho de placa sobre a indução de calos. Experimento 3.

Foram usados 2 tamanhos de placas, um, de 10 mm x 100 mm e outro, de 18 mm x 50 mm.

Na câmara de fluxo laminar, num frasco de 250 ml foi misturado 100 ml de meio **MSP** (aproximadamente 45°C) com 20 ml de suspensão celular em fase exponencial, já devidamente preparada para este propósito. O

frasco foi então, levemente agitado, vertendo nas placas maiores 20 ml e nas menores, 5 ml. Seguindo a metodologia de avaliação do experimento anterior, após 45 dias, a formação de micro calos em ambos tratamentos foi avaliada.

I.4.4 - Efeito da superfície do meio e concentração de agar sobre a indução de microcalos.

Com respeito à concentração de agar, foram usadas 3 concentrações, as quais foram (gr/l): 6,0, 8,0 e 10,0. O meio MSP após autoclavado, foi distribuído em 4 placas Petri por tratamento, na câmara de fluxo laminar, colocando-se 20 ml de meio por placa. Depois, quando o meio já endurecido, foi aplicado 1 ml de suspensão celular na superfície do agar, mediante bastonete de vidro. As placas ficaram sob condições padronizadas de luz e temperatura, igual que nos casos anteriores por 45 dias.

I.4.5 - Efeito de diferentes citocininas autoclavadas, aplicadas via "mistura", na indução de microcalos.

Experimento 5.0.

Foram testadas 3 citocininas, as quais foram: BAP, KIN e 2iP. A concentração de cada uma delas foi 0,5 mg/l no meio MSP, meio no qual, também foi adicionado 1,0 mg/l de ANA.

Para cada tratamento, foram preparados 80 ml de meio MSP, os quais, foram autoclavados em frascos erlenmeyers de 250 ml. Logo, resfriados na câmara de fluxo laminar, porém, quando ainda mornos, se lhes adicionou a cada um deles 20 ml de suspensão celular, em fase exponencial, agitando-se levemente e continuamente seu conteúdo foi distribuído em 4 placas de Petri (10 mm x 100 mm) com 20 ml cada uma. A seguir, as placas foram fechadas, seladas e mantidas por 45 dias no laboratório.

I.4.6 - Efeito de diferentes citocininas ultrafiltradas, aplicadas via "mistura", na indução de microcalos.

Experimento 6.

A diferença deste experimento com o anterior, apenas reside no fato que no meio MSP foi autoclavado sem as citocininas e, uma vez resfriado na câmara, se lhe adicionou as três citocininas ultrafiltradas conjuntamente com a suspensão celular para depois então, ser distribuído nas placas.

I.4.7 - Efeito de diferentes citocininas, ultrafiltradas, a partir de inóculo de suspensão celular aplicado via seringa, sobre a indução de microcalos.

Experimento 7.

Neste experimento, como no anterior, as citocininas, foram ultrafiltradas e misturadas, na câmara de fluxo laminar, com o meio MSP quando este resfriado, e logo distribuído nas placas. Deste modo, recém 24 h mais tarde 2 ml de suspensão, colocados mediante seringa de mola, foram injetados no interior do meio de cultura, a cada uma das 4 placas dos tratamentos correspondentes.

I.4.8 - Comparação do efeito entre o método de aplicação por "seringa" e de "mistura" da suspensão celular sobre o crescimento de calos.

Experimento 8.

Foram autoclavados 2 frascos, erlenmeyers de 250 ml, contendo meio MSP. Enquanto um, possuía 100 ml, o outro, 80 ml, porém, na câmara de fluxo laminar, a este último, lhe foram adicionados 20 ml de suspensão celular, fase exponencial, quando ainda morno. Depois e por

separado 20 ml de ambos frascos, foram distribuídos em cada uma das 5 placas de Petri (10 mm x 100 mm) que constituíam cada um dos 2 tratamentos, mas, nas placas oriundas do primeiro, 24 h depois, lhes foi injetado por meio de seringa de mola, 2 ml da mesma suspensão celular. Depois de 45 dias as placas foram avaliadas.

1.5.0 - Regeneração.

1.5.1 Crescimento de calos.

Os calos oriundos do plaqueamento dos diferentes tratamentos, foram transferidos a meio **MS** modificado, mas, não contendo nenhum regulador do crescimento. Foram sempre colocados 4 calos por frasco ou por placa. A composição deste meio foi:

Sais:

Macros

Micros

Vitaminas:

As mesmas de BC, porém, a 1 mg/l.

Orgânicos:

Inositol 100 mg/l.

Sacarose não PA 20 g/l.

Caseína hidrolisada 500 mg/l.

Agar Cialga 5,6 g/l.

Ajuste de pH: 5,8 com K OH 1 normal.

Autoclave: 120°C, 1 atmosfera, por 20 minutos.

Durante 30 dias, os calos ficaram sob condições padronizadas de luz e temperatura na sala de manutenção do laboratório e a menos que se indique o contrário, estas deverão subentender-se. O meio **MS** recém

descrito, será identificado doravante por MSR-1.

I.5.2 - Indução de brotações.

Experimento 1.

Na câmara de fluxo laminar, calos friáveis provenientes do meio MSR-1, foram transferidos aleatoriamente para o mesmo meio, porém, contendo diferentes combinações de 2,4-D e adenina. O esquema experimental, contendo 4 placas por tratamento e 4 inóculos de calo, aproximadamente de 5,0 mm de diâmetro, por placa, está no Quadro 1. A avaliação sobre o número de brotos foi feita aos 30 dias.

Quadro 1. Relação de concentração entre 2,4-D e adenina em calos de plaqueamento.

Adenina (mg/l)	2,4-D (mg/l)		
	0,0	0,5	1,0
0,0	1*	2	3
5,0	4	5	6
10,0	7	8	9
20,0	10	11	12

* número do tratamento.

I.5.3 - Transferência de calos para concentrações crescentes de adenina. Experimento 2.

Calos provenientes de plaqueamento, e que tinham passado por MSR-1, durante 30 dias, foram transferidos na câmara de fluxo laminar, para meio MSR-2 (MSR-1 + 10 mg/l de Adenina) e 30 dias após, para MSR-3 (MSR-1 + 20 mg/l de Adenina), num período total de 90 dias, após o qual, os calos foram novamente retornados a MSR-1. Foram usados 25 frascos, contendo cada um 30 ml de meio e um calo por frasco. Após cada um dos períodos respectivos, foram feitas avaliações sobre as brotações.

1.5.4 - Efeito do amido de milho, no crescimento de brotações de calos. Experimento 3.

Calos que já tinham passado por **MSR-1**, **MSR-2** e **MSR-3**, foram transferidos para **MSR-1** com e sem amido de milho (maizena 7%), sendo que, neste último caso, não foi usado ágar, e a maizena, foi adicionada após o ajuste do pH, mesmo assim, este foi checado novamente. Foram usados 16 frascos de aproximadamente 400 ml cada um, contendo 100 ml de meio. Em cada um deles, foram colocados 4 calos que apresentavam pequenas brotações filamentosas de aproximadamente 1 cm de comprimento. Após 60 dias o crescimento das brotações foi avaliado.

1.5.5 - Efeito do aumento da concentração de açúcar, no crescimento das brotações. Experimento 5.

Este experimento foi similar ao anterior, apenas que foi usada ágar em lugar da maizena e o meio **MSR-1** possuía açúcar a 3 e 6% com um total de 10 frascos por tratamento.

1.5.6 - Efeito do Ag NO_3 sobre a indução de brotações. Experimento 6.

Calos friáveis amarelados, que vinham sendo mantidos em **MSF** foram inoculados em meio **MSR-3**, suplementado com Ag NO_3 , nas seguintes concentrações (mg/l): 0,0, 1,25, 2,5, 5,0 e 10,0. Em cada tratamento, 8 frascos, foram usados 16 calos com aproximadamente 10 mm de diâmetro cada um, sendo que, cada frasco possuía 30 ml de meio. O experimento teve uma duração de 120 dias e durante esse período, o teor de adenina foi reduzido de 20 mg/l para 10 mg/l e deste, para 0,0 mg/l aos 30, 60 e 90 dias. As avaliações do número de brotações foram realizadas a cada 30 dias.

I.6.0- Crescimento e bulbificação de plântulas.

I.6.1- Efeito de diferentes níveis de sacarose sobre a bulbificação. Experimento 1.

Plantas que tinham passado por maizena e por MSR-1 e que, tinham um tamanho aproximado de 10 a 15 cm de comprimento, foram colocados em MS modificado o qual consistiu de:

Sais:

Macros/2, porém, suplementados com K_2HPO_4 170 mg/l.

Micros, mas, Fe-EDTA/2.

Vitaminas:

Ausentes.

Orgânicos:

Inositol ausente.

Sacarose não PA 30 g/l.

Agar Cialga 5,6 g/l.

Hormônios:

Ausentes.

pH e autoclavagem similar aos casos anteriores. A denominação deste meio foi MSC.

Com base neste meio, foram testados 3 concentrações de açúcar, as quais, foram (%): 3,0, 4,5 e 6,0. As plantas utilizadas, não apresentavam bulbificação. Foram usadas 10 plântulas por tratamento, sendo que, em cada frasco de 400 ml, 100 ml de meio foram colocados. Como de praxe, as condições de luz e temperatura foram as padronizadas da sala de manutenção do laboratório, e a menos que se indique o

contrário deverão subentender-se. Os tratamentos foram avaliados após 60 dias por simples verificação de bulbificação.

1.6.2 - Efeito do AIB sobre a bulbificação.

Experimento 2.

Plantas já desenvolvidas, 10 e 15 cm de comprimento com bastante raízes e pouca bulbificação, que vinham sendo mantidas em **MSC**, foram transferidas para frascos de 400 ml com 100 ml de meio **MSC** e 6 % de açúcar, porém, com e sem **AIB** (3 mg/l). Foram usadas 12 plantas por tratamento. No tratamento com **AIB**, as plantas permaneceram 30 dias, após o qual, foram transferidas para **MSC+6 %** de açúcar, ficando então, na mesma condição que as controle. A medição do diâmetro dos bulbos foi feita com régua comum do lado de fora dos frascos, aos 60 dias de iniciado o experimento.

RESULTADOS

II.1 - Dos experimentos sobre contaminação por fungo.

Após umasemana, os bulbilhos dos três tratamentos com NaClO (hipoclorito de sódio) apresentaram um alto índice de germinação (brotações foliares emergindo) em torno de 80% com níveis baixos de contaminação por fungo, Quadro 1. Nos três casos, porém, a contaminação quando ocorreu, desenvolveu-se na parte basal dos bulbilhos.

Quadro 1. Efeito de diferentes tempos do NaClO sobre a contaminação fúngica em Branco Mineiro.

Tempo de exposição (minutos)	30	45	60
% de bulbilhos contaminados	16	12	12

Em relação ao segundo experimento, Benlate vs. tipo de explantes, foi verificado que nem aos sete dias e nem aos quinze dias, houve contaminação dos frascos, porém, a contaminação surgiu a partir do terceiro experimento, vale dizer, no experimento onde não foi incluído Benlate no meio. De acordo com o Quadro 2, o tipo de explante que mais mostrou contaminação para os tempos de 30 45, e 60 minutos foi o colo seguido de longe pela raiz, entretanto, os explantes foliares praticamente não apresentaram contaminação. Em nenhum caso foi observada contaminação bacteriana.

Quadro 2. Efeito dos diferentes tempos de NaClO sobre a contaminação dos explantes após suas passagens por MS mais Benlate.

Tempo (min.)	Tipo de explante			
	Colo	F. ext.	F. int.	Raiz
	% de frascos contaminados			
30	70	0	10	30
45	50	0	10	10
60	60	0	0	20

A análise microscópica de amostras de meios contaminados revelou que o fungo que predominantemente contaminou os explantes de colo e raiz pertenceu ao gênero *Fusarium*. Uma menor proporção de outros fungos, esteve representada por *Rhizopus* e *Penicillium*¹.

Com relação ao quarto experimento, Quadro 3, foi verificado que efetivamente o Benlate nas concentrações de 100 e 200 mg/l, inibiu o crescimento de *Fusarium*, pois o tamanho do inóculo não se modificou, mas, nos controles, aos sete e quinze dias o alastramento da contaminação tomou toda a superfície disponível dos meios. Fig. 27A e 27B.

Quadro 3. Efeito de diferentes doses de Benlate sobre o crescimento de *Fusarium* em meio MS.

Número de dias	Doses de Benlate (mg/l)		
	0,0	100,0	200,0
	% de frascos contaminados		
7	100,0	0,0	0,0
15	100,0	0,0	0,0

¹Reconhecimento feito no Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

II.2 - Experimentos preliminares, à suspensão celular.

2.1. Regeneração de plântulas a partir de calos envelhecidos de Branco Mineiro e Chonan.

Os calos sob tratamento com adenina mostraram uma porcentagem de brotações mais alta que os controles, (Quadro 4), entretanto a resposta do BM foi maior que a de Ch, mas em ambos casos, as brotações foram de cor verde, inúmeras e seu comprimento, oscilou entre 10 e 20 mm. Todavia, foi verificado que a melhor concentração em ambos cultivares foi de 20 mg/l.

Quadro 4. Efeito da adenina sobre a indução de brotações em calos BM e Ch.

Cultivar	Adenina (mg/l)		
	0,0	20	40
	% de calos brotados		
BM	25	100	35
Ch	12	70	28

2.2 Indução de calos a partir de brotações regeneradas *in vitro* de BM e Ch.

Tanto em um, como em outro cultivar, a indução de calos se deu nos explantes correspondentes das brotações envelhadas e não nos das lâminas foliares, Quadro 5, inclusive muitos dos explantes advindos das lâminas foliares secaram ou necrosaram, fenômeno este pouco observado nos outros explantes.

II.3 Estabelecimento e manutenção de células em meio líquido.

Quadro 5. Comparação de explantes de origem *in vitro* em relação à indução de calos.

Cultivar	Tipos de explantes	
	Brotações enoveladas	Lâmina foliar
	% de calos	
BM	60,0	0,0
Ch	52,0	0,0

II.3.1 Obtenção de calos aclorofiláceos friáveis mediante 2,4-D.

Efetivamente o 2,4-D tanto aos 30 como 60 dias promoveu a diminuição do caráter verde dos calos aumentando a porcentagem heterotrófica dos mesmos. Isto foi particularmente claro, na concentração de 1,0 mg/l de 2,4-D aos 60 dias em calos de ambos cultivares, (Quadro 6. Fig. 28A e 28B).

Quadro 6. Efeito de 2,4-D sobre a presença de cor verde em calos BM e Ch.

2,4-D (mg/l)	Branco Mineiro	
	% de calos clorofiláceos aos 30 dias	% de calos clorofiláceos aos 60 dias
0,0	80,0	80,0
0,5	70,0	50,0
1,0	60,0	40,0

2,4-D (mg/l)	Chonan	
	% de calos clorofiláceos aos 30 dias	% de calos clorofiláceos aos 60 dias
0,0	90,0	90,0
0,5	65,0	30,0
1,0	55,0	25,0

Os calos que foram transferidos para meio MSF com o passar do tempo, foram tornando-se de cor bege ou amarelos claros, porém, altamente friáveis, ao ponto de não poderem ser manipulados com pinças, e sim com espátula.

II.4 - Curvas de crescimento

4.1. Efeito de diferentes combinações de 2,4-D e BAP.

Conforme se pode apreciar nas Fig. 2 e 5, as curvas de crescimento da população celular nos diferentes tratamentos seguiu invariavelmente um mesmo padrão, isto é, atingiram um platô (steady state) sempre precedidas por uma acentuada inclinação das curvas. Entretanto na Fig. 2, este platô foi alcançado à quarta semana, em uma curva, enquanto que nas outras, foi alcançado às duas semanas, nas concentrações de 2,4-D/BAP de 0,0/0,0 mg/l e 0,5/0,0 mg/l, e na quarta, para a concentração de 0,0/0,5 mg/l. Cabe destacar que a adição de meio BC com 0,5 mg/l de 2,4-D e BAP nos dois primeiros casos mencionado, não alterou o platô da quinta semana em diante. Por outro lado, em outras situações, foi verificado que o valor no qual o platô se estabilizou não foi constante, Figs. 28C e 28D. Assim, Fig. 5, enquanto 0,5/0,5 mg/l e 1,0/0,5 mg/l de 2,4-D/BAP, se estabilizaram em 35 mm de diâmetro, 2,0/0,5 mg/l, da mesma relação hormonal, se estacionou perto dos 30 mm de diâmetro de sedimento, quer dizer, neste último caso, o crescimento caiu. Este também diminuiu, Fig. 2, nas concentrações de 0,0/0,0 mg/l e 0,5/0,0 mg/l, mas não assim, em 0,0/0,5 mg/l, onde já a partir da quinta semana o sedimento celular alcançou 35 mm de diâmetro.

Com relação à taxa de crescimento relativo (TCR) da população celular, avaliada a partir dos diâmetros dos sedimentos nos diferentes tratamentos de 2,4-D, foi verificado em geral, que esta ao longo do tempo foi caindo, com exceção, de um caso, Fig. 3, no qual entre a primeira e segunda semana esta aumentou, porém inexoravelmente da segunda semana em diante, também começa a declinar alcançando um valor zero a partir da terceira semana, vale dizer, em todos aqueles casos no qual o platô das culturas primárias começa a ser atingido, a TCR assume valores mínimos, Fig. 3 e 6. Entretanto, na Fig. 3, verificou-se um atraso no valor zero da TCR da curva correspondente à concentração de 0,0/0,5 mg/l, isto porque, apenas a partir da quarta semana de cultura, as células entraram num "steady state" definido.

No tocante ao pH das suspensões, a tendência dele foi variável, modificando-se ao longo do tempo. Em geral, esta tendência esteve relacionada com uma queda gradual do pH de extensão variável no tempo; um valor mínimo após esta queda; e no final, uma tendência a subir. Houve também exceções a este padrão, e foi proporcionado pelo comportamento do pH de 0,5/0,5 mg/l e 2,0/0,5 mg/l de 2,4-D/BAP.

Por outro lado, verificou-se em geral, que esta queda do pH na primeira e segunda semana, Fig. 4, coincidiu com a fase ascendente das respectivas curvas de crescimento, Fig. 2 e 5 mas, nas curvas de pH, Fig. 7, esta situação é menos clara, por causa da elevação prematura do pH.

Com relação à análise estatística, Apêndice I, Quadro 1 e 2, a análise de variância revelou significância para: Semanas, 2,4-D, BAP e interação dos três fatores.

O desdobramento desta análise, Apêndice I, Quadro 3 em diante, entre doses de 2,4-D (0,0 mg/l e 0,5 mg/l) dentro de doses de BAP, e vice versa, ou seja, entre doses de BAP (0,0 mg/l e 0,5 mg/l), mas, dentro de cada uma das doses de 2,4-D, o desdobramento estatístico

revelou significância variável ao longo das semanas, demonstrando com isso, que o efeito de um fitormônio, as vezes, foi mais influente que o do outro através do tipo. Assim, quando analisado o efeito do ponto de vista do 2,4-D, primeira semana, foi observado uma diferença altamente significativa, mas, no caso do BAP, esta diferença foi apenas significativa, ou seja, o efeito do 2,4-D, na primeira semana, foi mais decisivo. Contudo, à segunda semana, foi observado exatamente o contrário, isto é, um efeito de BAP superior aquele do 2,4-D, e assim através do tempo, a influência destes dois fatores, foi variando mas em geral, foi observado um efeito mais decisivo de BAP que do 2,4-D.

Com relação à análise estatística das doses maiores de 2,4-D e doses constantes de BAP, Apêndice II, Quadro 1, foi verificado apenas significância para os fatores tempo e dose e não para a interação.

No desdobramento estatístico, foram comparadas as médias entre doses de 2,4-D dentro de cada semana, Apêndice II, Quadro 4, e doses entre semanas Apêndice II, Quadro 5.

No primeiro caso, Quadro 4, foi constatado que a partir da segunda semana as doses de 2,4-D/BAP 0,5/0,5 mg/l e 1,0/0,5 mg/l, tiveram efeitos semelhantes e diferentes de 2,0/0,5 mg/l, ainda segundo o mesmo quadro, esta última dose perdeu para as duas primeiras em termos de diâmetro de sedimento celular.

No segundo caso, Quadro 5, foi observado que a partir da segunda semana, não houve diferenças significativas dentro de cada um dos tratamentos.

Quanto aos inóculos utilizados, o peso da matéria seca dos 10 ml de suspensão celular, revelou uma média de $36,4 \pm 1,34$ mg, ou que, na maioria dos tratamentos forneceu um diâmetro inicial de aproximadamente 10 mm. Esta quantidade de sedimento, em função das curvas obtidas, Fig 2 e 5, permitiu às células multiplicar-se e tornar possível o monitoramento do seu crescimento nos diferentes tratamentos. Quando

amostras de células foram tomadas, aproximadamente aos 15 dias de idade, fase ascendente das curvas, e observadas ao microscópio, Fig. 29, estas se apresentaram, pequenas, redondas e formando agregados maiores ("clusters") difíceis de contar o número de células. Entretanto, frequentemente foi observado presença de núcleos volumosos e redondos nos agregados menos densos. Em outros casos, embora menos frequentes se observaram células em citocinese, todavia mais raramente foram observadas células tubulares lisas ou retorcidas ("coiled").

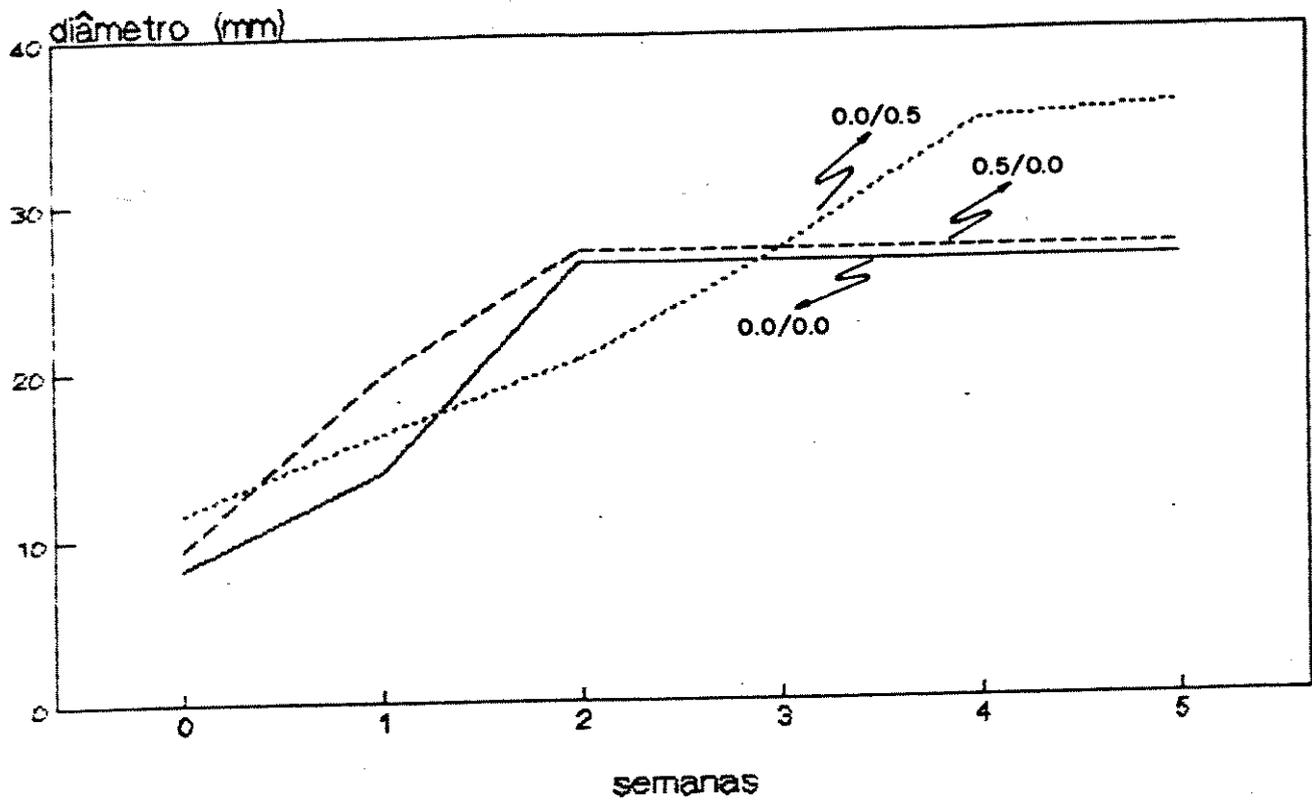


Fig. 2. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D/BAP (mg/l): 0.0/0.0, 0.0/0.5 e 0.5/0.0, no crescimento do diâmetro do sedimento celular da suspensão celular de Chonan, através do tempo.

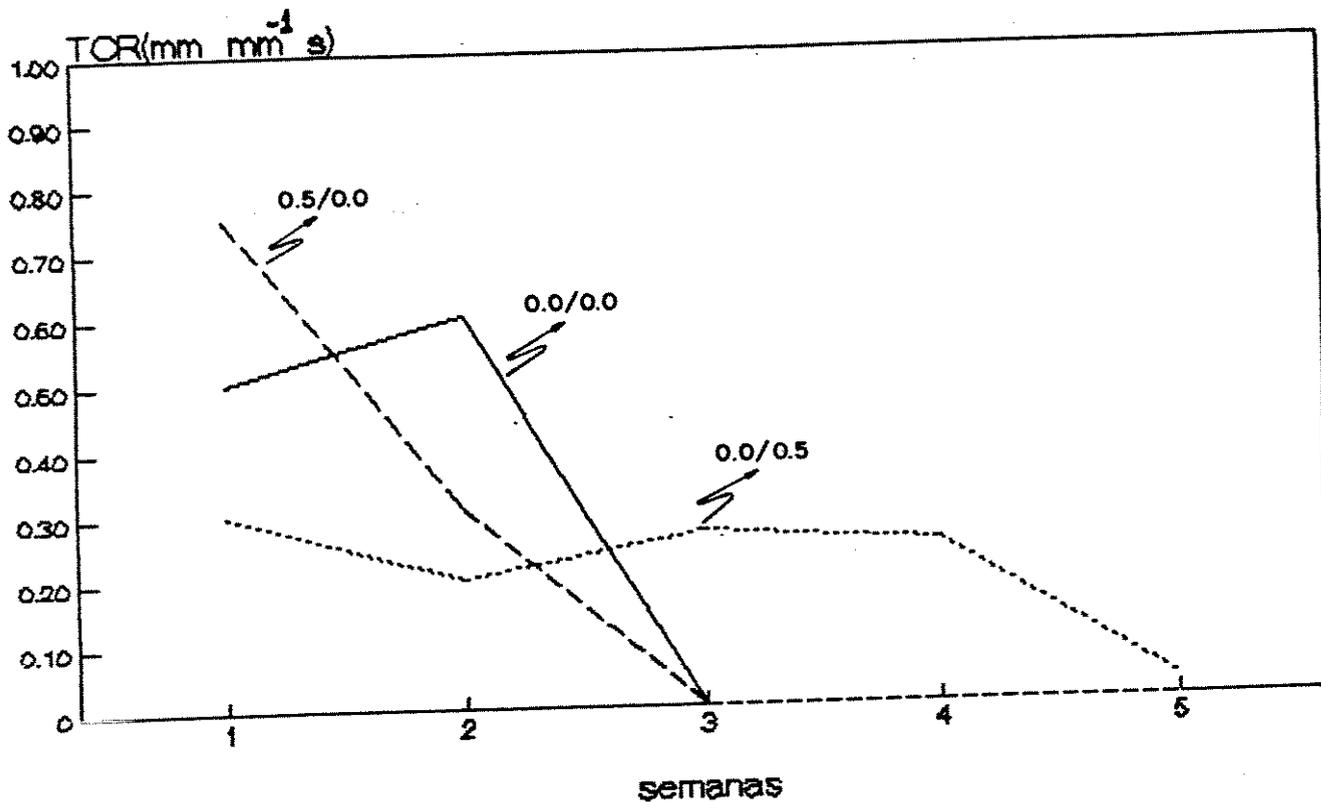


Fig. 3. Variação da taxa de crescimento relativo (TCR) da suspensão celular de Chonan, através do tempo, sob diferentes concentrações de 2,4-D/BAP (mg/l): 0.0/0.0, 0.0/0.5 e 0.5/0.0.

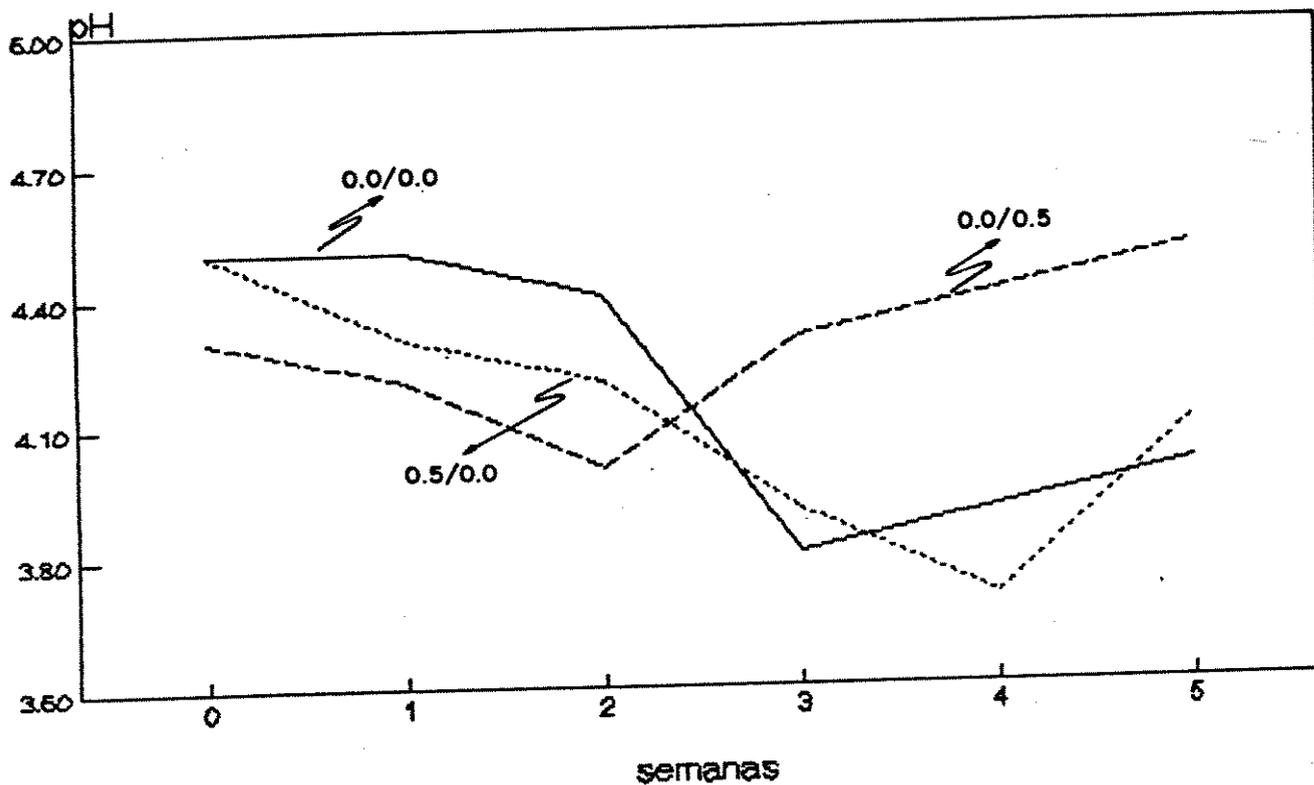


Fig. 4. Variação do pH na suspensão celular de Chonan, através do tempo, sob diferentes concentrações de 2,4-D/BAP (mg/l): 0.0/0.0, 0.0/0.5 e 0.5/0.0.

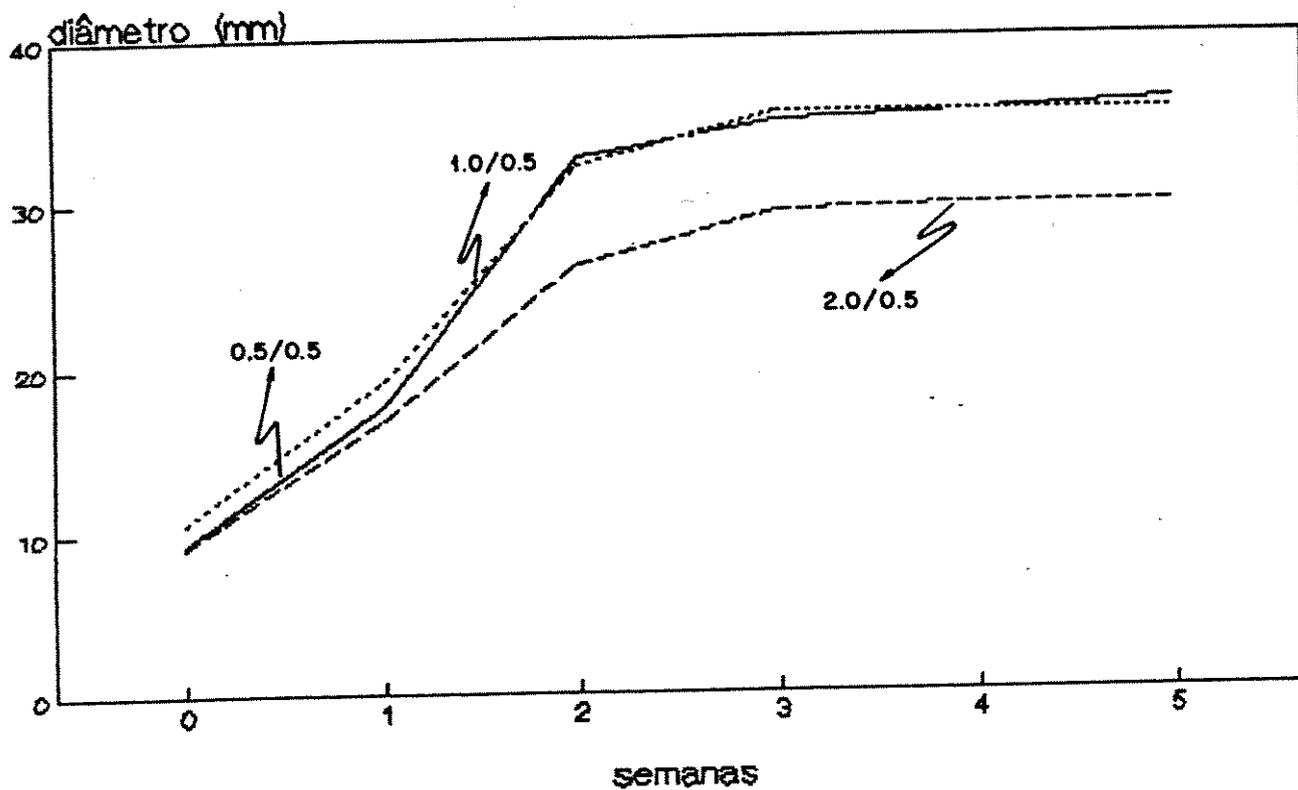


Fig. 5. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D/BAP (mg/l): 0.5/0.5, 1.0/0.5 e 2.0/0.5, no crescimento do diâmetro do sedimento celular da suspensão celular de Chonan, através do tempo.

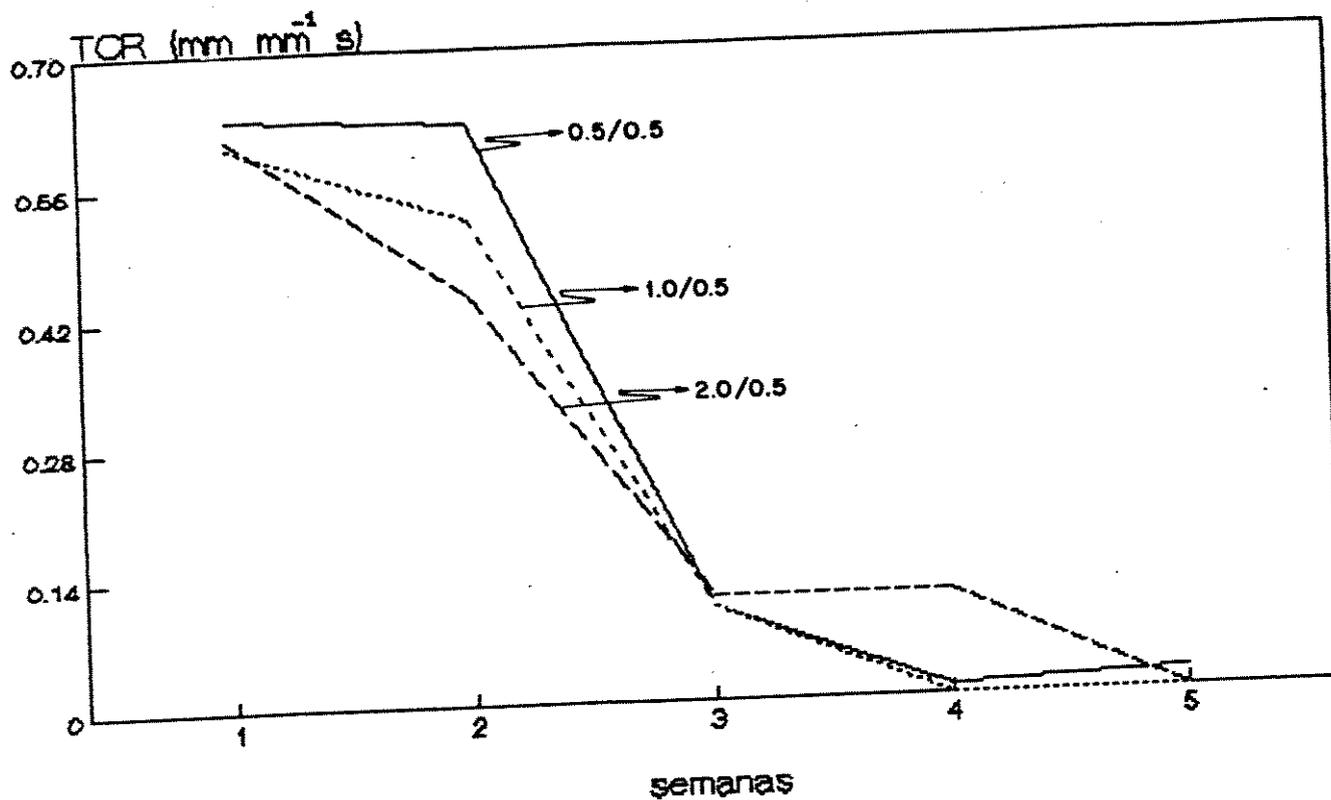


Fig. 6. Variação da taxa de crescimento relativo (TCR) da suspensão celular de Chonan, através do tempo, sob diferentes concentrações de 2,4-D/BAP (mg/l): 0.5/0.5, 1.0/0.5 e 2.0/0.5.

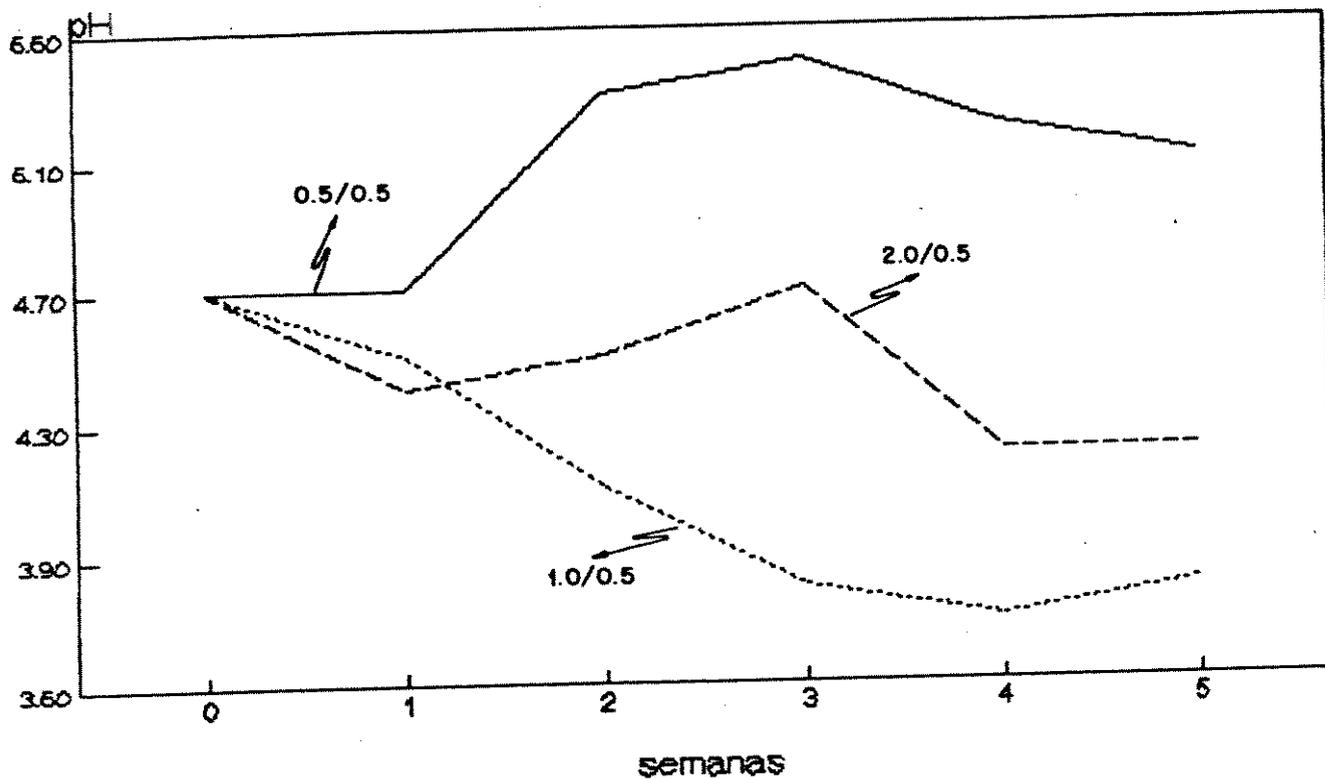


Fig. 7. Variação do pH na suspensão celular de Chonan, através do tempo, sob diferentes concentrações de 2,4-D/BAP (mg/l): 0.5/0.5, 1.0/0.5 e 2.0/0.5.

4.2. Efeito do MES no crescimento da cultura primária.

Experimento 2

O teste de F da análise de variância, Apêndice III: Quadro 3, entre níveis de MES dentro de semanas, não revelou diferenças significativas nos três tratamentos considerados. Diferenças significativas, apenas foram encontradas entre semanas dentro de doses, Apêndice III: Quadro 4. O Quadro 5 do mesmo apêndice, apresenta o desdobramento da análise de variância do Quadro 4. Nele constata-se que entre as duas primeiras médias não houve diferenças entre si, similar situação aconteceu entre as duas últimas médias em cada um dos níveis de MES. Por outro lado, verifica-se na segunda semana, nas três doses, que as médias são diferentes estatisticamente com relação à primeira semana, e com respeito à terceira; diferenças estatísticas não existiram nos níveis 0,0 mg/l e 0,5 mg/l, porém, sim no nível de 1,0 mg/l.

Com respeito às curvas, a Fig. 8 apresenta o perfil das curvas das diferentes doses utilizadas, podendo destacar-se, uma fase inicial de crescimento lento, uma de crescimento rápido e finalmente uma de crescimento estacionário. Do ponto de vista estatístico, não houve diferenças entre as médias dentro de cada uma das semanas.

Em relação à Fig. 9, chama a atenção o alto valor da TCR nos três gráficos, e muito especialmente a do controle. De um outro ponto de vista, a tendência da TCR repete o que já foi observado no experimento anterior, isto é, a entrada em franco declínio das taxas a partir da segunda semana em diante.

Com respeito ao pH, Fig. 10, a inclusão do tampão não evitou a modificação deste, inclusive, observou-se que também, o mesmo padrão de curva que nas situações anteriores, Fig. 4, ou seja, uma descida inicial com uma tendência a subir depois. Entretanto, neste caso o tampão manteve o pH num nível alto inicialmente (5,6), coisa que o controle não foi capaz de manter mostrando um pH de 5,2.

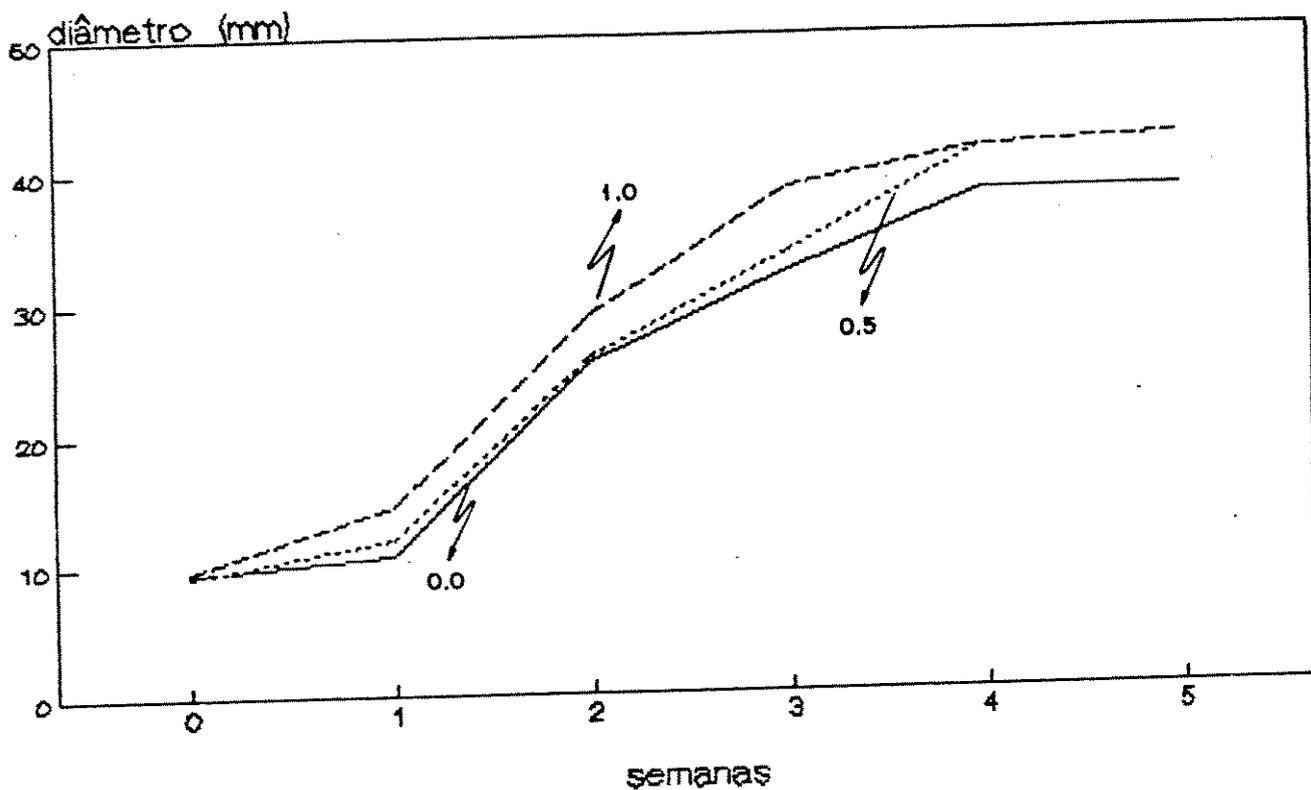


Fig. 8. Efeito de diferentes concentrações de MES (g/l): 0.0, 0.5 e 1.0, no crescimento do diâmetro do sedimento celular da suspensão celular de alho, cv. Chonan, através do tempo.

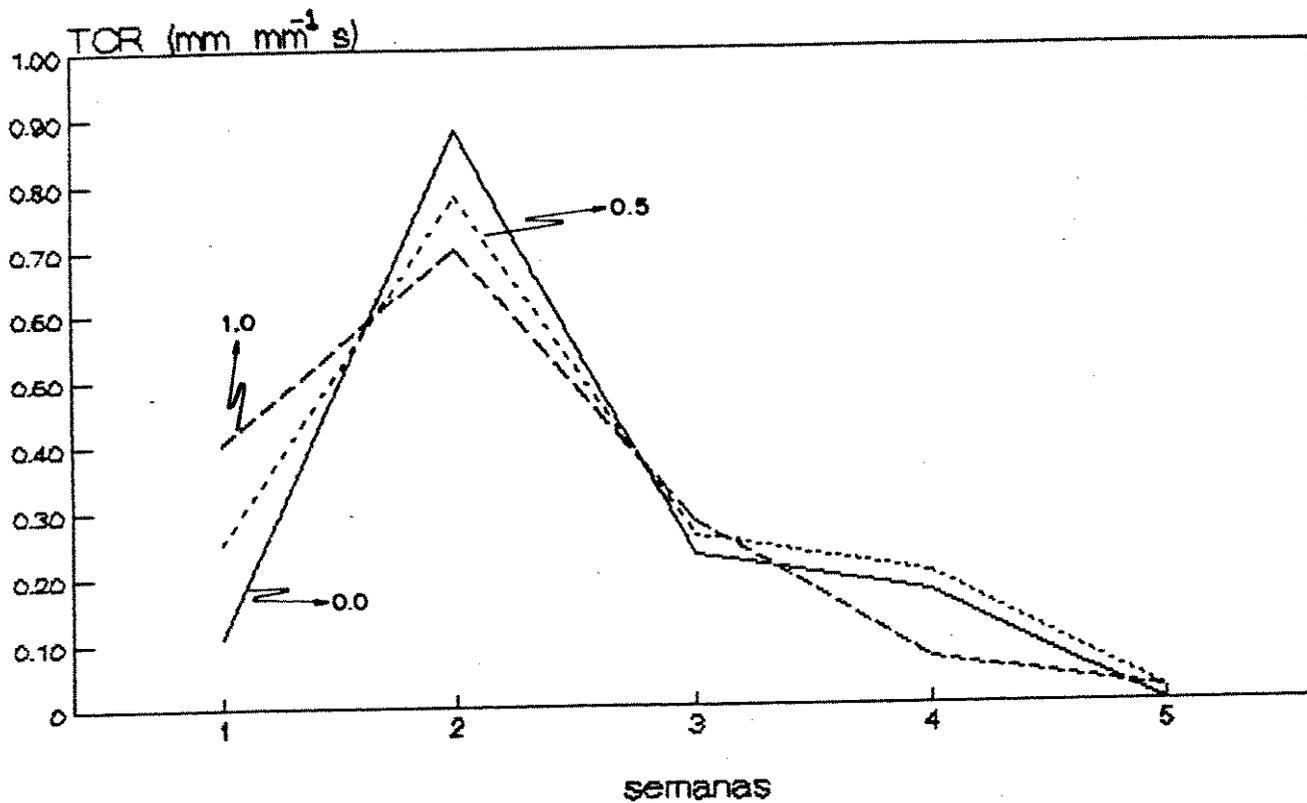


Fig. 9 Variação da taxa de crescimento relativo (TCR) da suspensão celular do alho, cv Chonan, através do tempo, sob diferentes concentrações de MES (g/l): 0.0, 0.5 e 1.0.

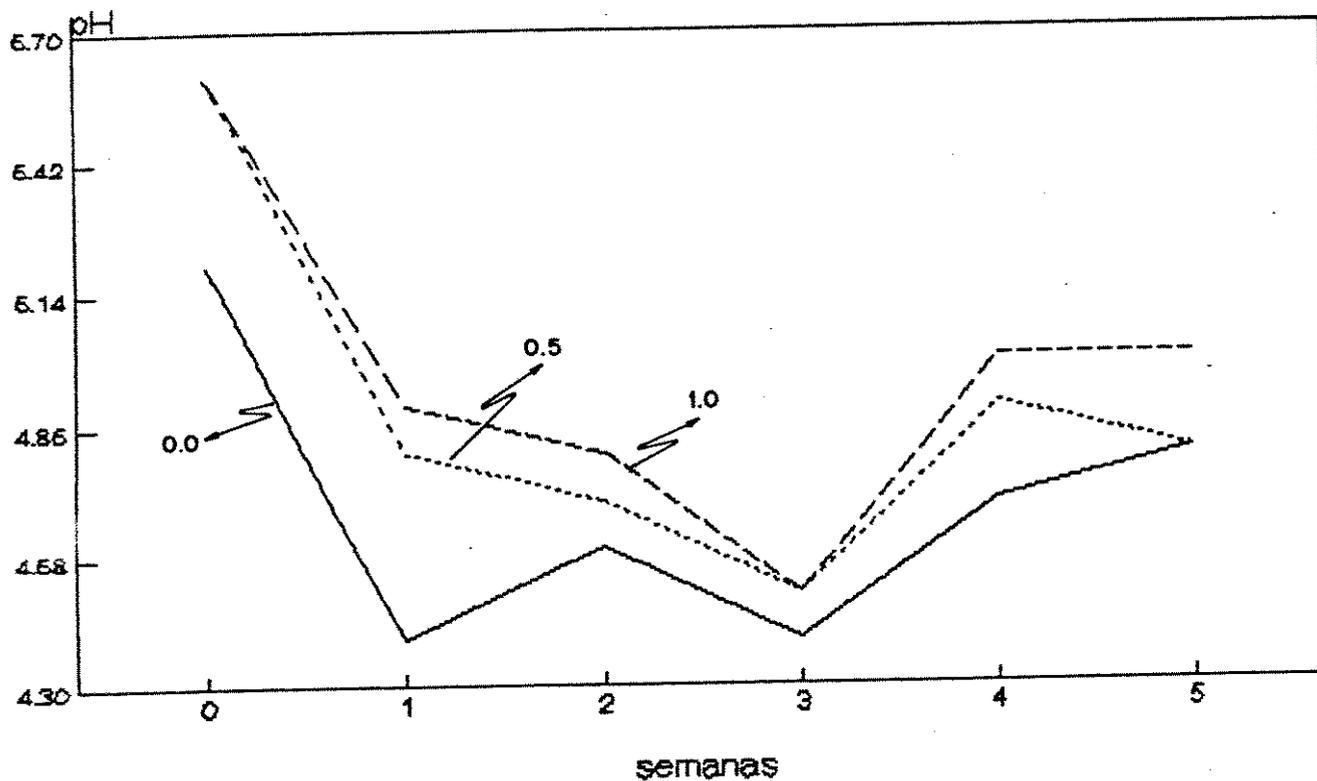


Fig. 10. Variação do pH na suspensão celular de alho, cv. Chonan, através do tempo, sob diferentes concentrações de MES (g/l): 0.0, 0.5 e 1.0.

4.3. Efeito do rifaldin no crescimento da cultura primária.

Experimento 3.0

Os resultados da análise de variância geral, Apêndice IV, Quadro 2, mostra que houve significância estatística tanto para as variáveis isoladas como para a interação das mesmas.

A comparação dos quatro níveis de rifaldin utilizados, Quadro 5, mostra dentro da primeira, terceira e quarta semana, não haver diferenças significativas nas médias contrastadas, mas as diferenças, embora parciais, concentram-se na primeira, segunda e quinta semana. No mesmo Quadro, fica claro que rifaldin na dose de 20 mg/l registrou valores absolutos menores que aquele das outras doses, no crescimento da população celular, embora isto não signifique diferenças estatísticas no final do experimento, quinta semana, com zero e 5,0 mg/l e sim apenas com 10,0 mg/l, mas esta, não diferiu das últimas doses recém mencionadas. Baseado neste fato, pode-se afirmar que nos níveis de Rifaldin utilizados o crescimento das células, não foi prejudicado, principalmente, no caso de 10,0 mg/l na segunda semana, onde o crescimento da população celular superou ao controle.

Por outro lado, entre semanas e dentro dos níveis de antibiótico, Apêndice IV: Quadro 6, foi observado de um modo geral, que as diferenças foram se tornando evidentes conforme o tempo foi transcorrendo, muito embora, no início da quarta semana, estas diferenças desapareceram e se mantiveram na quinta.

De acordo com as curvas da Fig. 11, o padrão das mesmas não foi alterado pelo rRifaldin, não se observando um efeito tóxico do antibiótico em relação às células, apenas que nas doses mais altas, houve um atraso na entrada da fase ascendente da curva, este atraso reflete-se claramente na Fig. 12, onde a taxa de crescimento nesse período é a mais baixa, mas nem por isso, a tendência desta curva foi diferente das outras o que equivale a dizer que a performance geral da divisão celular não foi modificada.

Com relação ao pH, Fig. 13, também aqui observa-se a mesma tendência de variação entre as curvas deste experimento e a dos anteriores. Talvez, a maior concentração de rifaldin tenha afetado apenas ao valor mínimo deste, num determinado momento, mas não, à tendência das células, no meio líquido, de fazer descer primeiramente e depois subir o pH.

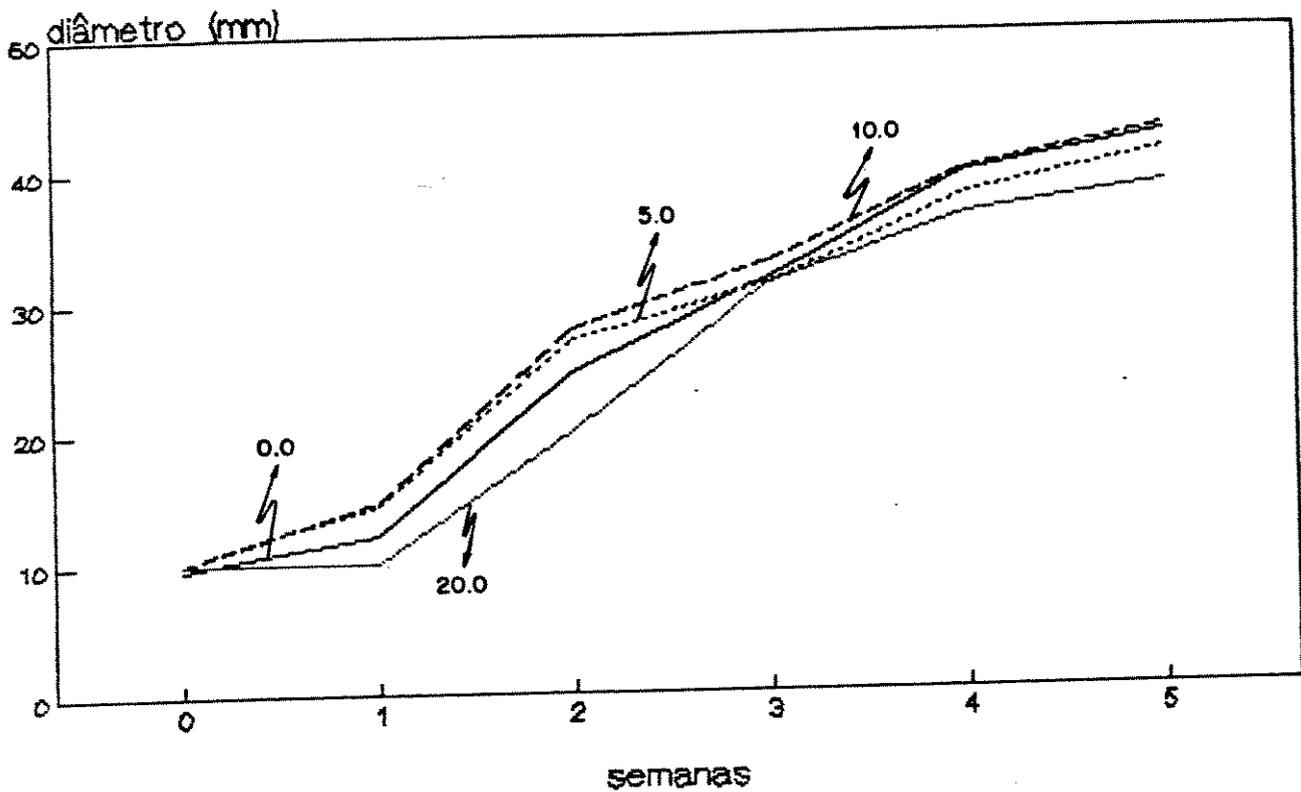


Fig. 11. Efeito de diferentes concentrações de rifaldin (mg/l): 0.0, 5.0, 10.0 e 20.0 no crescimento do diâmetro do sedimento celular da suspensão celular de alho, cv. Chonan, através do tempo.

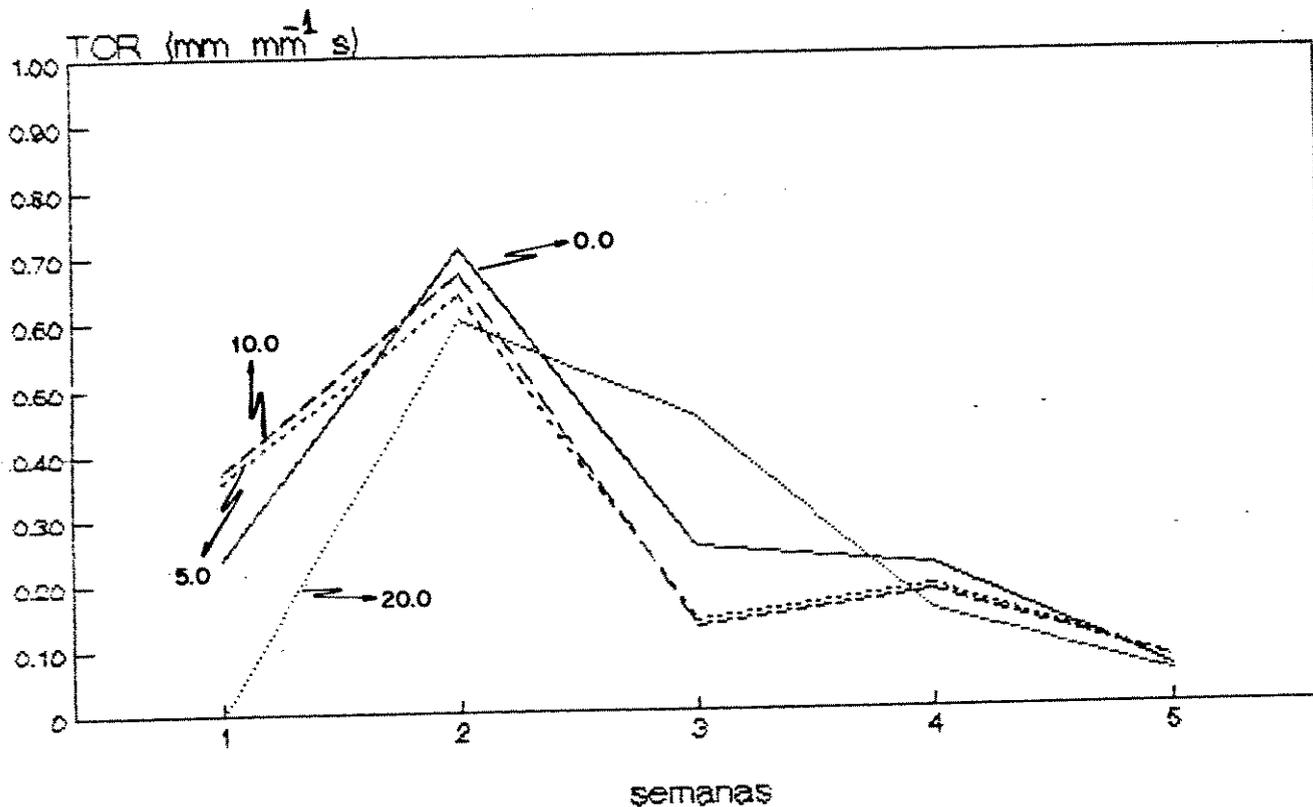


Fig. 12. Variação da taxa de crescimento relativo (TCR) da suspensão celular de alho, cv Chonan, através do tempo, sob diferentes concentrações de rifaldin (mg/l): 0.0, 5.0, 10.0 e 20.0.

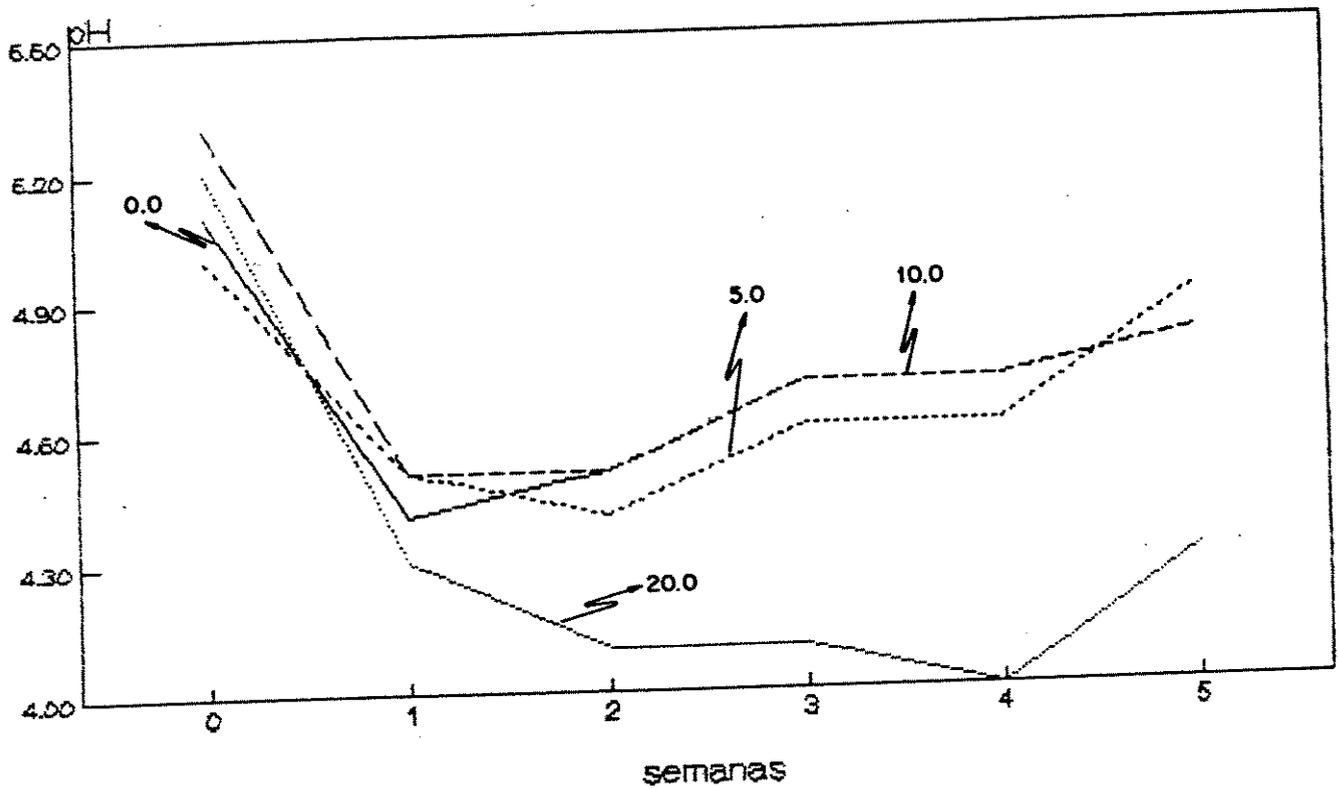


Fig. 13. Variação do pH na suspensão celular de alho cv Chonan, através do tempo, sob diferentes concentrações de rifaldin (mg/l): 0.0, 5.0, 10.0 e 20.0.

4.4. Comparação entre sacarose PA e sacarose comercial não PA, sobre o crescimento da cultura primária.

Experimento 4.

Muito embora o quadro geral da análise de variância, Apêndice V: Quadro 2, tenha detectado diferenças significativas nos tratamentos pelo teste de F, a interação não foi significativa. Por isso, dentro deste contexto não foram encontradas diferenças significativas entre fontes de sacarose dentro das semanas, porém, as diferenças tornaram-se significativas entre as semanas dentro de fonte de sacarose como era previsto acontecer. No Quadro 5 por exemplo, observa-se que entre o começo do experimento e o final, o diâmetro do sedimento das suspensões nos dois tratamentos, quase triplicou, mas, este aumento foi gradual até a quarta semana, onde a partir daí ficou estacionário, contudo, as diferenças estatísticas praticamente desaparecem da terceira semana em diante.

Por outro lado, a quantidade de inóculo inicial neste experimento foi algo superior ao dos outros, embora, também tenha-se usado 10 ml de suspensão inicial. O peso da matéria seca deste volume foi $40,6 \pm 3$ mg. Talvez por isso, o controle tenha-se aproximado à casa dos 50 mm de diâmetro de sedimento celular final.

Em geral, a coloração do sedimento celular foi de uma tonalidade amarela clara, igual aos dos outros experimentos, entretanto, nesta oportunidade em dois frascos, um de cada tratamento, surgiram algumas pintas vermelhas na suspensão celular, a partir da segunda semana, mas que, no decorrer do tempo foram desaparecendo e já na quinta semana tinham completamente desaparecido. Cabe mencionar não obstante, que a coloração da suspensão celular do tratamento com açúcar não PA, no final do experimento, culminou com uma coloração amarela bege e não amarela clara, como foi o caso das células mantidas em açúcar PA, mas de qualquer forma, a transparência do meio em ambos tratamentos foi similar, isto é, límpida como em todos os casos anteriores.

Em relação à Fig. 14, as curvas de crescimento correspondente às duas fontes de sacarose apresentam na primeira semana uma curta fase de crescimento lento, uma segunda fase de crescimento rápido e bastante prolongada, da primeira à quinta semana, e uma franca fase estacionária desde a quinta à sexta semana.

A análise de variância, Apêndice V Quadro 3, com respeito a estas curvas, mostrou não haver diferenças significativas entre as médias das duas fontes dentro de cada semana.

Quanto às curvas das TCR, Fig. 15, estas voltam a apresentar um padrão típico de subida e descida, sendo o valor da segunda semana o ponto de inflexão destas tendências. Por outro lado, chama a atenção o baixo valor destas taxas, porém, na segunda semana a suspensão com açúcar PA foi maior, apesar que, na primeira semana tenha acontecido o contrário.

Com relação ao pH, Fig. 16, estas também apresentaram um mesmo padrão entre si e em relação aos casos anteriores. De outro lado, ambas curvas, apesar de partirem de um mesmo pH, sucede que ao longo do tempo, no caso das células em açúcar não PA, apresentaram valores de pH mais inferiores.

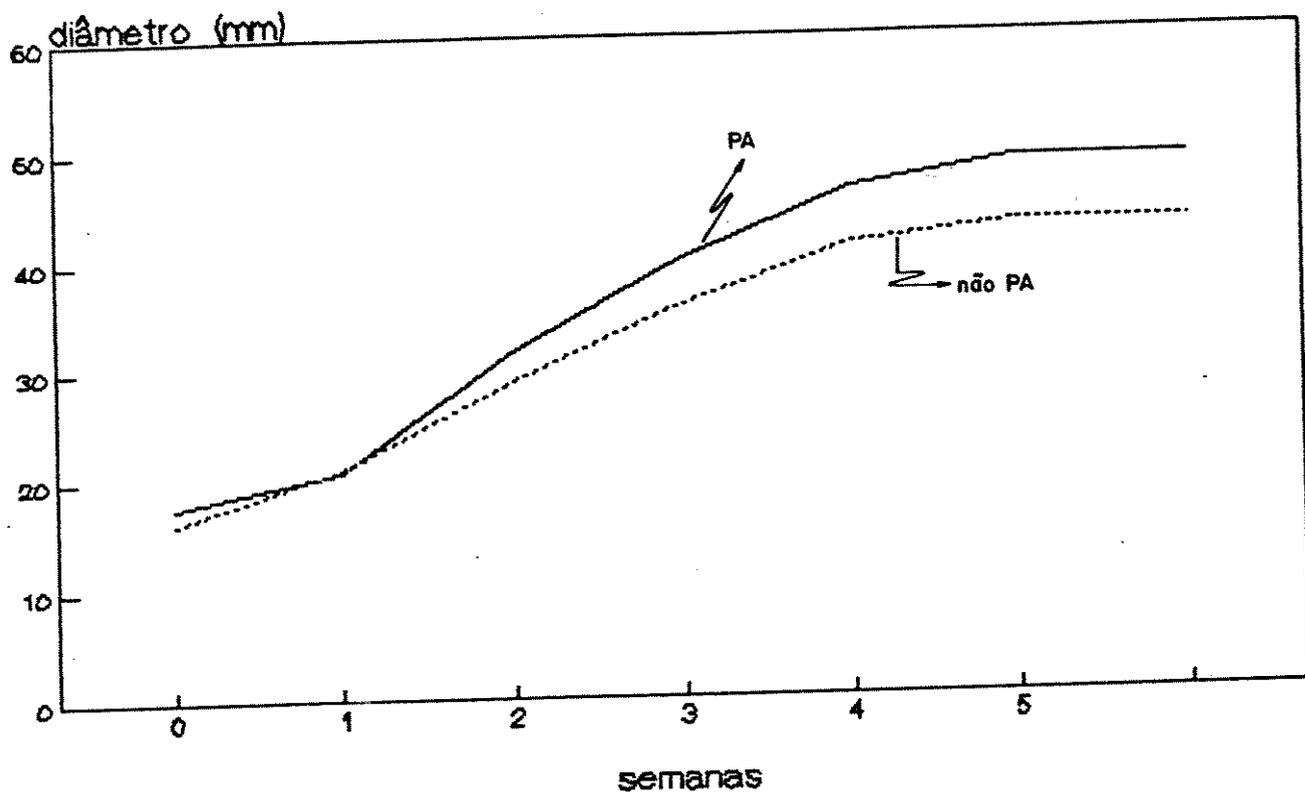


Fig. 14. Efeito da sacarose PA e não PA (20,0 g/l) no crescimento do diâmetro do sedimento celular da suspensão celular de alho, cv Chonan, através do tempo.

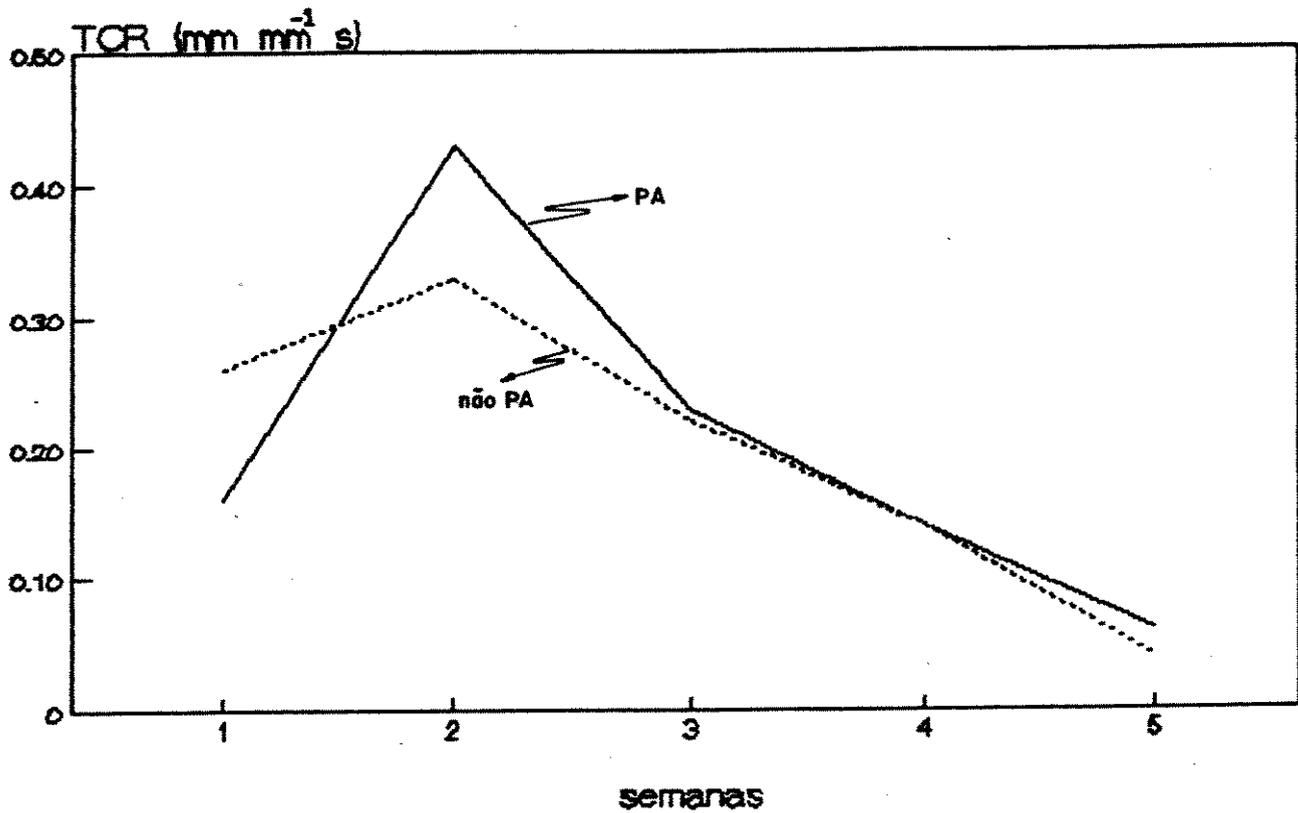


Fig. 15. Variação da taxa de crescimento relativo (TCR) da suspensão celular de alho, cv Chonan, através do tempo com sacarose PA e não PA.

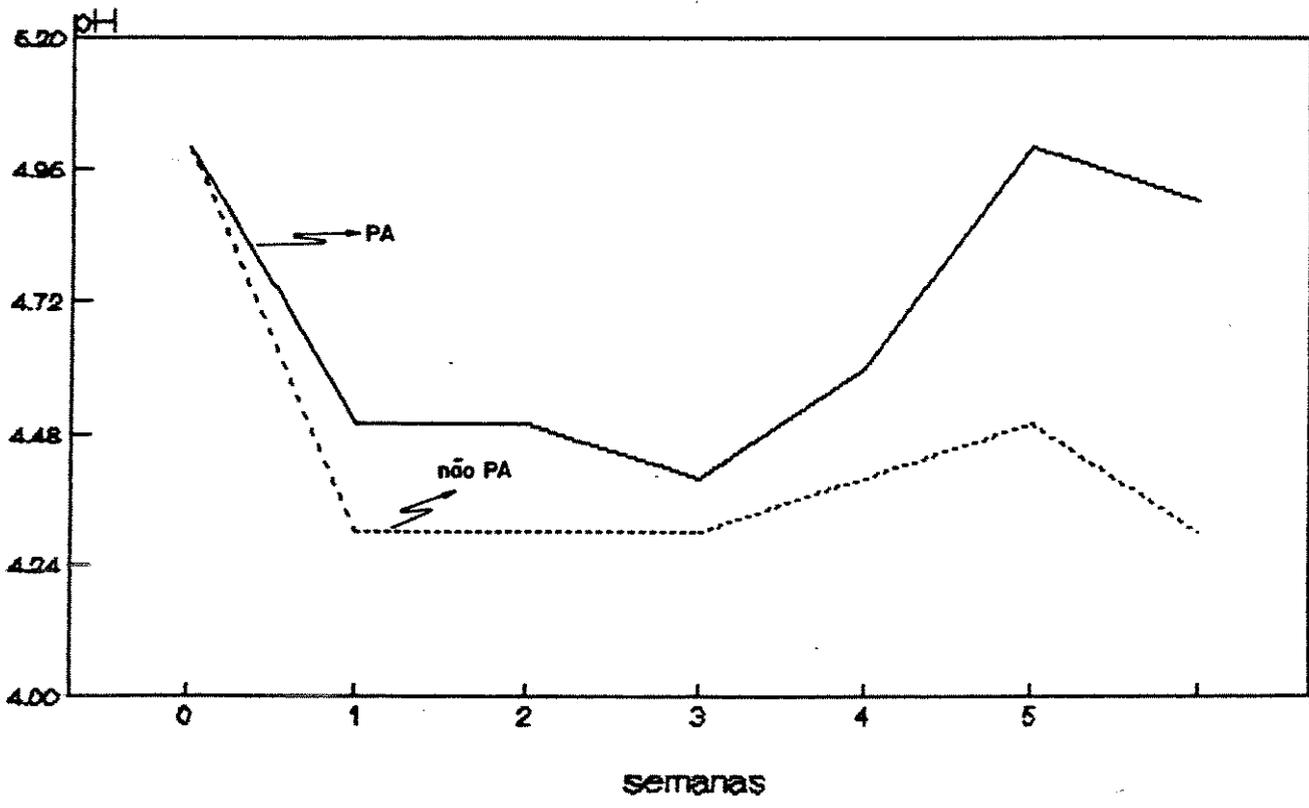


Fig. 16. Variação do pH na suspensão celular de alho cv Chonan, através do tempo, com sacarose PA e não PA.

4.5. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio, sobre o crescimento da cultura primária.

Experimento 5.

Conforme é apresentado no Apêndice VI, Quadro 2, a análise de variância, detectou diferenças altamente significativas. No desdobramento da análise, para fontes dentro de semana, Quadro 5, verificou-se que não houve efeitos estatísticos diferentes para zero e primeira semana, mas, estes efeitos começaram a se tornar significativamente diferentes, a partir da segunda semana em diante. Interessante foi constatar no mesmo quadro, que o controle foi diferente estatisticamente de todas as outras fontes na terceira semana, isto significa que o maior diâmetro de sedimento celular, portanto de crescimento populacional, foi conseguido com a combinação de fontes de nitrogênio do meio BC.

A segunda fonte de nitrogênio que estimulou mais o crescimento, segundo o mesmo quadro, foi aquela na qual KNO_3 e NH_4NO_3 estiveram conjuntamente presentes no meio. Nos tratamentos onde estiveram isolados, como fonte de nitrogênio, a glutamina, KNO_3 e NH_4NO_3 , o teste de Tuckey não detectou diferenças estatísticas entre elas, sendo portanto, os menores efeitos sobre o crescimento populacional. Na Fig. 17 e 20, estes efeitos são corroborados. Como os inóculos iniciais foram altamente uniformes, atribui-se estas diferenças aos mesmos tratamentos.

Na Comparação de médias, entre semanas, mas, dentro de fontes separadamente, Apêndice VI, Quadro 6, verificou-se que em todos os tratamentos a partir da primeira semana, começou um estímulo forte no crescimento celular, e que este estímulo praticamente não parou até a quarta semana, no controle, $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ e NH_4NO_3 , mas, no caso de glutamina este "ímpeto" começa a enfraquecer-se a partir da segunda semana, e no caso de KNO_3 , a partir da terceira. Neste quadro, aprecia-se também a superioridade do controle em termos de diâmetro de sedimento.

Na Fig. 17, registram-se os diferentes perfis das TCR, verificou-se, que, apenas algumas curvas, apresentaram um padrão em consonância com a maioria dos anteriores, isto é, um pico máximo à segunda semana. No controle isto foi claro, Fig. 21, e seu pico foi mais alto que em $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$. Inclusive, o valor da TCR do controle, Fig. 21, à terceira semana foi maior que o correspondente ao de $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$, por isso talvez, o valor do diâmetro do sedimento nesta semana, tenha sido 37,7 mm no controle, e no outro 31,75, Apêndice VI, Quadro 6. Estas duas altas TCR do controle, não observadas nos demais tratamentos, permitiram um crescimento superior em relação às outras fontes.

Com relação ao pH, tanto nos tratamentos, como no controle, Fig. 19 e Fig. 22, verificou-se uma mesma tendência, isto é, uma elevação precedida por uma queda sensível, com a ressalva que, a elevação no caso de KNO_3 e glutamina foi mais brusca. Entretanto, esta recuperação não se traduziu num maior aumento de densidade populacional. Inclusive o caso do KNO_3 e glutamina é ilustrativo, porque o pH, apesar de ter subido para níveis considerados mais aptos fisiologicamente, não teve um reflexo paralelo mais edificante no aumento da densidade populacional, a partir da segunda e terceira semana respectivamente. Tudo isto contrasta fortemente com o controle, que, com um pH muito mais baixo, Fig. 22, nesse período (fase exponencial), alcançou a fase estacionária com um valor maior no diâmetro do sedimento celular que o correspondente a KNO_3 e glutamina (Apêndice VI, Quadro 6).

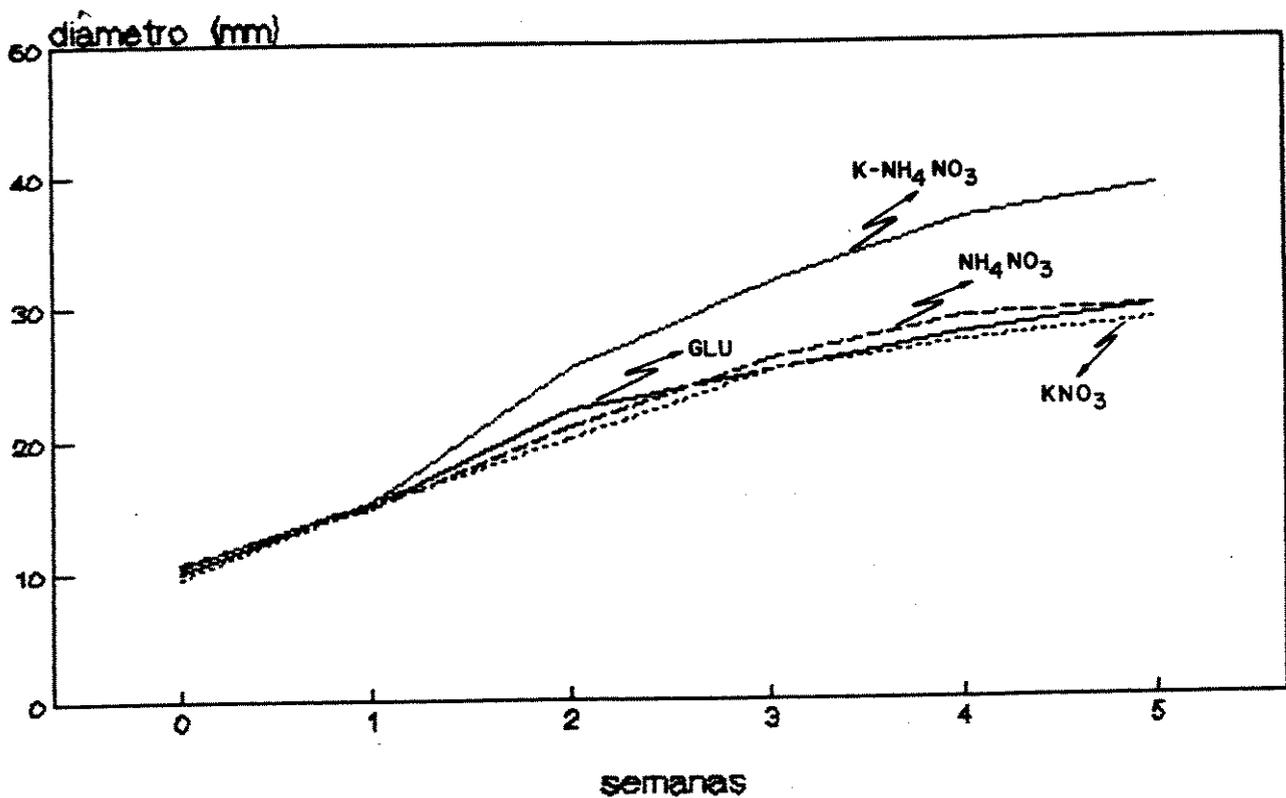


Fig. 17. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio: L-glutamina, KNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ ($\text{K} - \text{NH}_4\text{NO}_3$), sobre o crescimento do diâmetro do sedimento celular da suspensão celular de alho, cv Chonan, através do tempo.

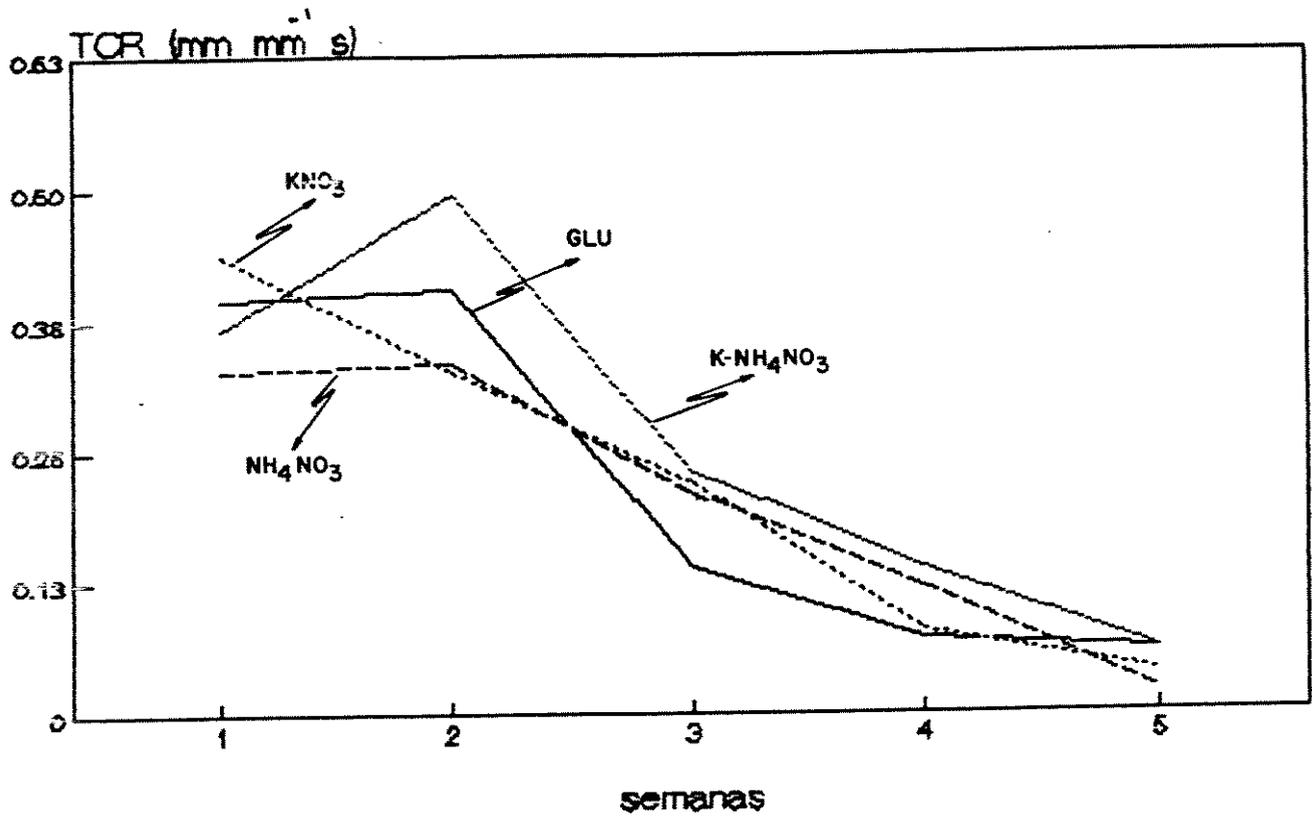


Fig. 18. Variação das taxas de crescimento relativo (TCR), da suspensão celular de alho, cv Chonan, através do tempo, sob diferentes fontes de nitrogênio: L-glutamina, KNO_3 , NH_4NO_3 , $KNO_3 + NH_4NO_3$ ($K - NH_4NO_3$).

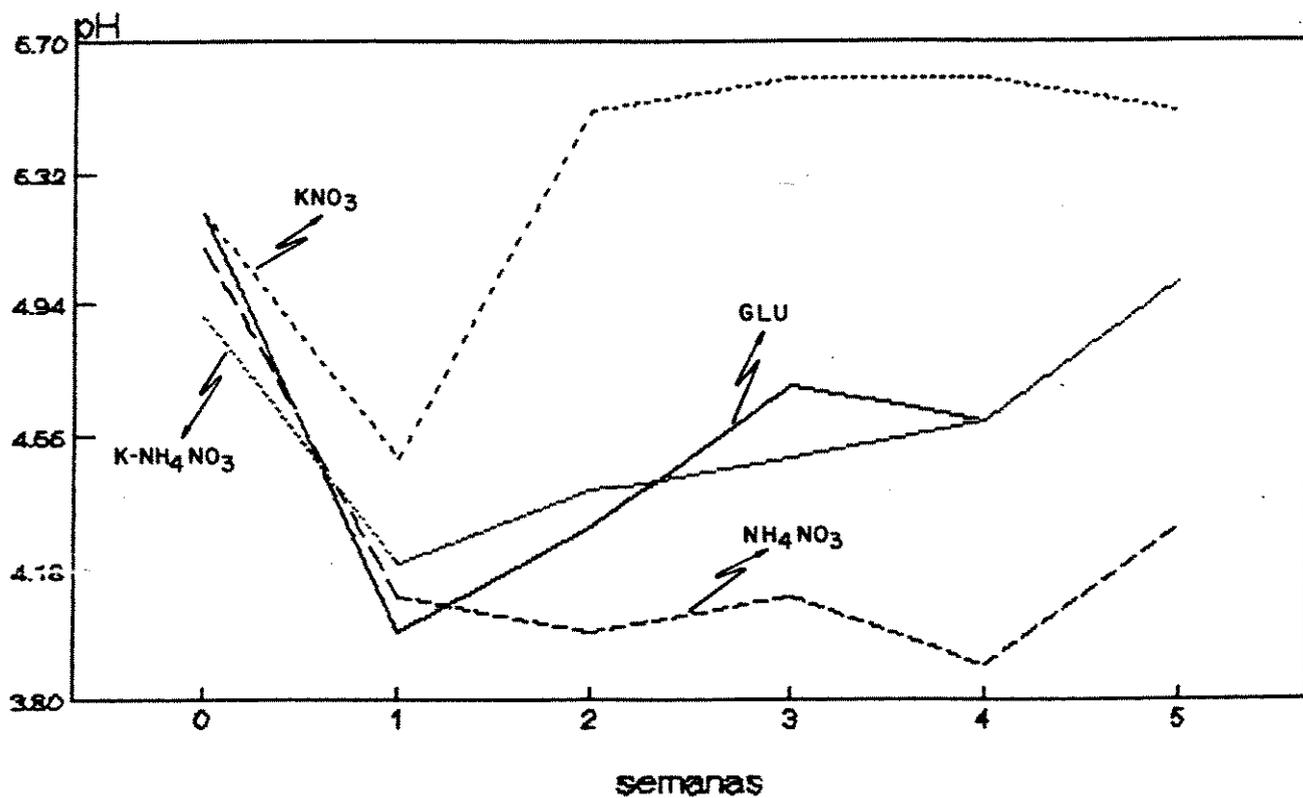


Fig. 19. Variação de pH na suspensão celular de alho, cv Chonan, através do tempo sob diferentes fontes de nitrogênio: L-glutamina, KNO_3 , NH_4NO_3 , $KNO_3 + NH_4NO_3$ (K - NH_4NO_3).

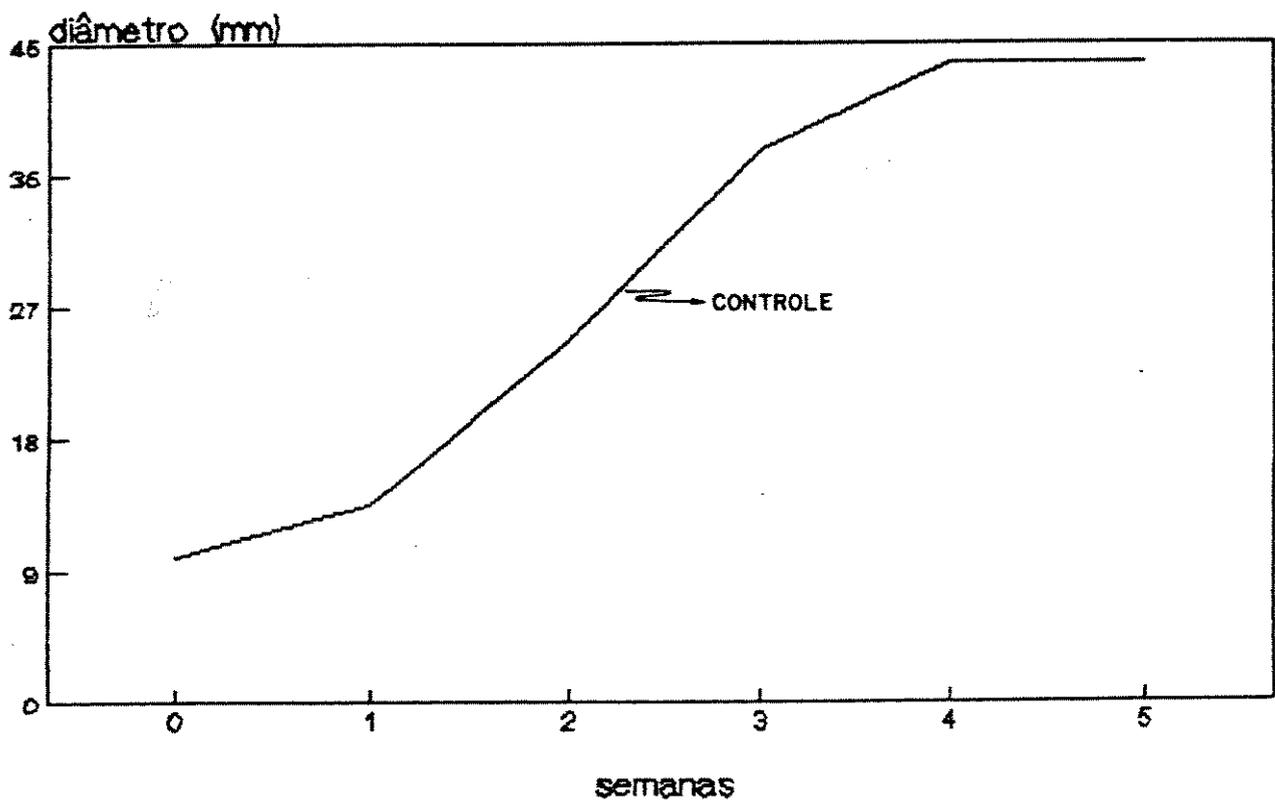


Fig. 20. Controle dos tratamentos da Fig. 17., contendo: L-glutamina, $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ como fontes de nitrogênio.

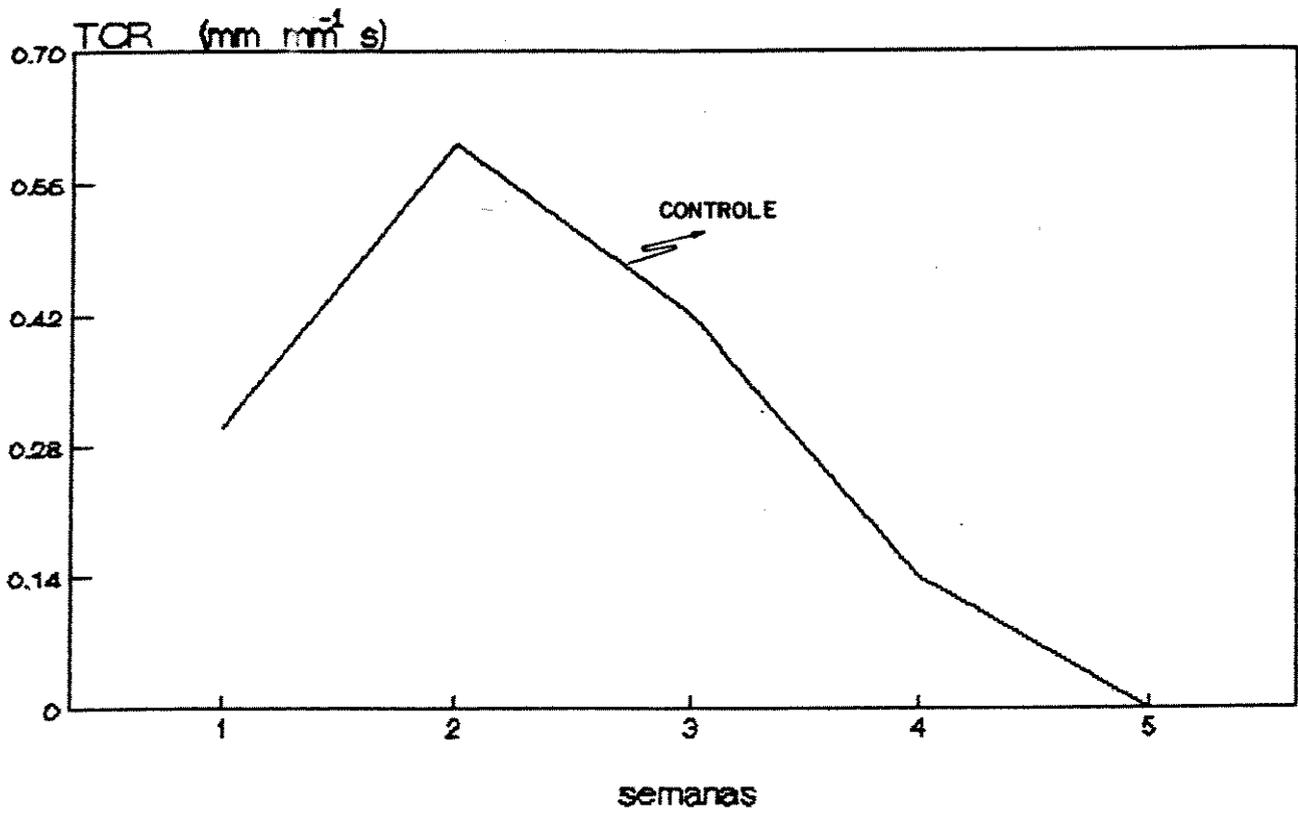


Fig. 21. Taxa de crescimento relativo (TCR) do controle (Fig. 20).

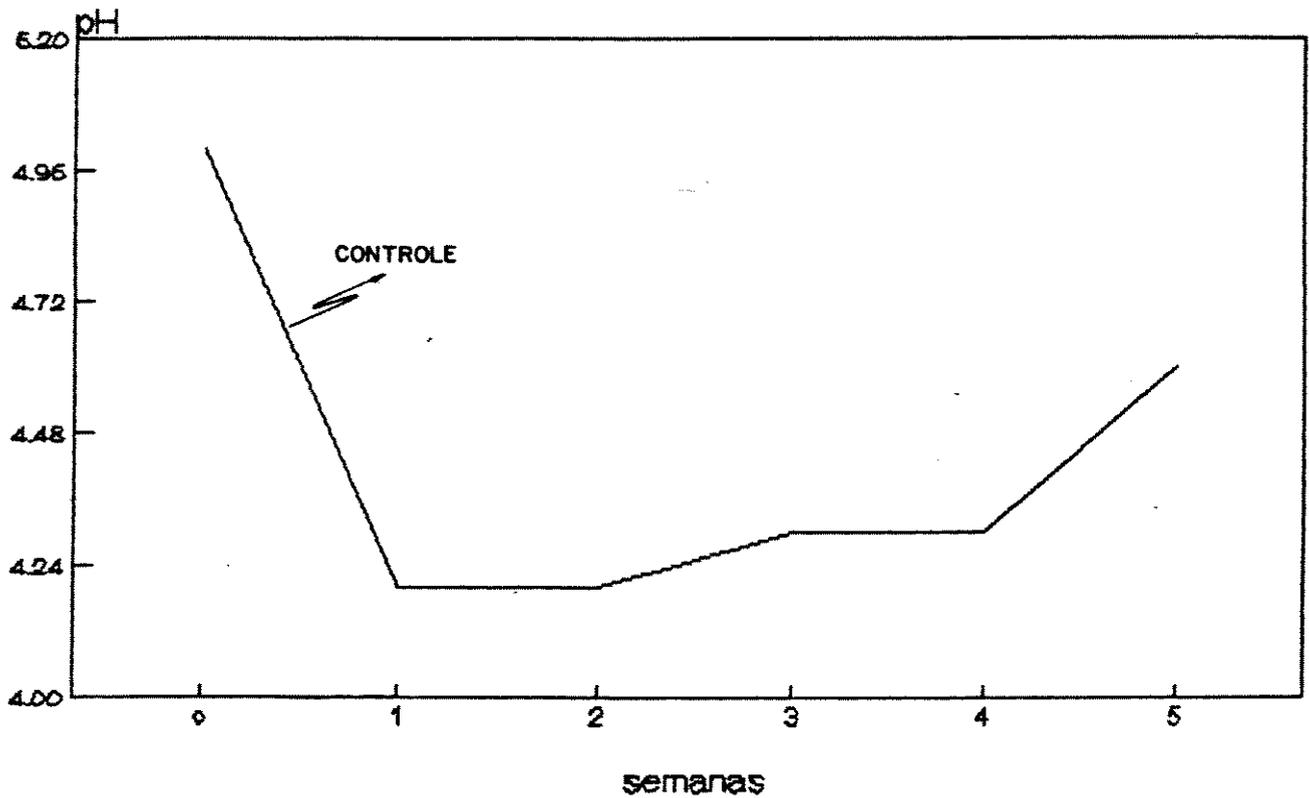


Fig. 22. Variação do pH na suspensão celular do controle (Fig. 20).

II.5 Avaliação do pH do meio MSF de calos friáveis

Os resultados da primeira avaliação do pH, Fig. 23 e 24, indicaram que os calos amarelos claros e amarelos bege alteraram o pH de seus respectivos meios. Assim, nos meios em que estavam os amarelos claros, o pH variou de 4,1 a 5,6, enquanto que o meio dos amarelos bege, esta variação foi 4,1 a 6,2. Contudo, o que caracterizou melhor esta diferença foi a frequência de casos. Assim, nos amarelos claros a maior frequência se centrou no pH 5,0 e nos amarelos bege em 4,4.

Dois meses após, a frequência máxima dos amarelos claros se deslocou para 4,7, enquanto que, a dos amarelos bege, se manteve no mesmo valor, Fig. 25 e 26. Cabe assinalar que a cor dos meios, em ambas amostras não se alterou, e em ambas avaliações o pH inicial dos meios, antes de colocar os calos, foi na primeira vez $5,1 \pm 0,08$, e na segunda, $5,16 \pm 0,005$ de desvio padrão.

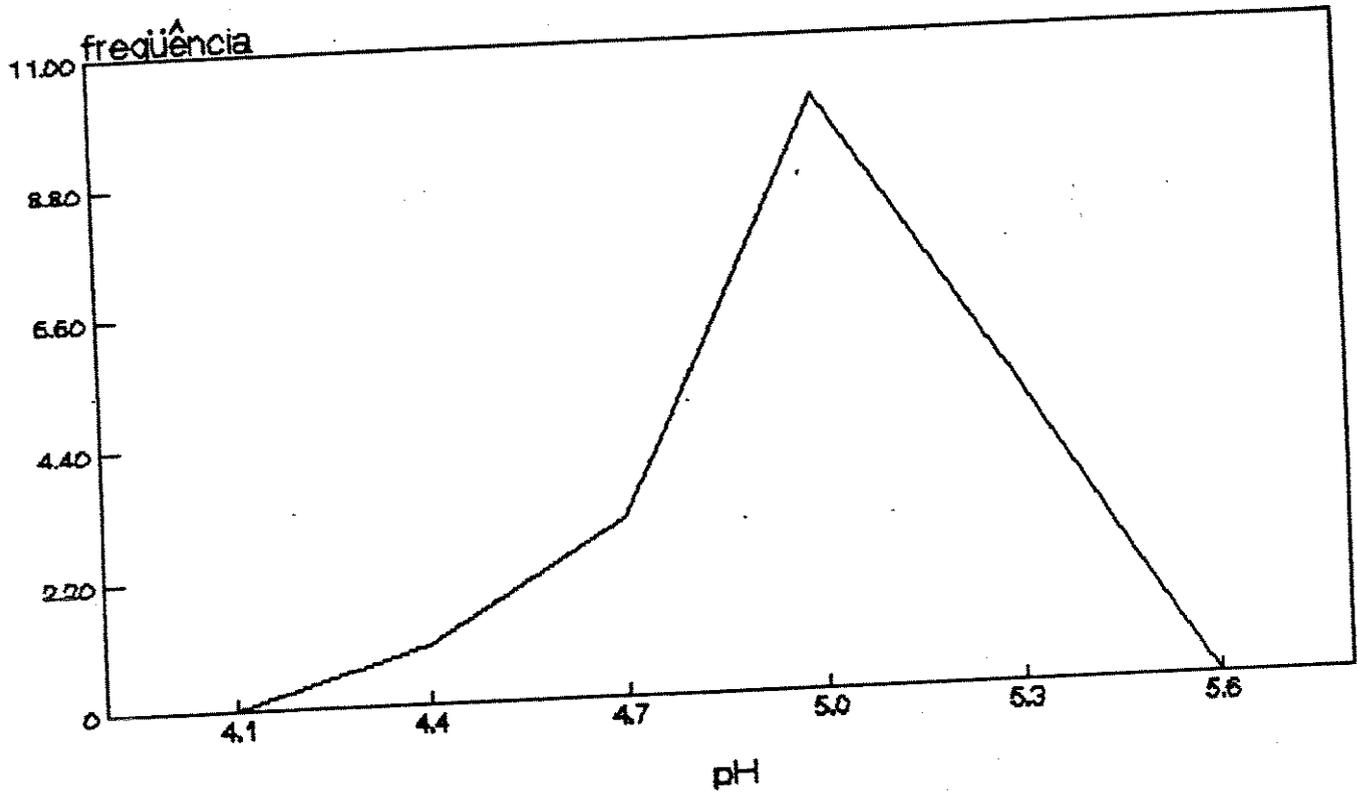


Fig. 23. Distribuição de frequência de calos amarelos em relação ao pH do meio.

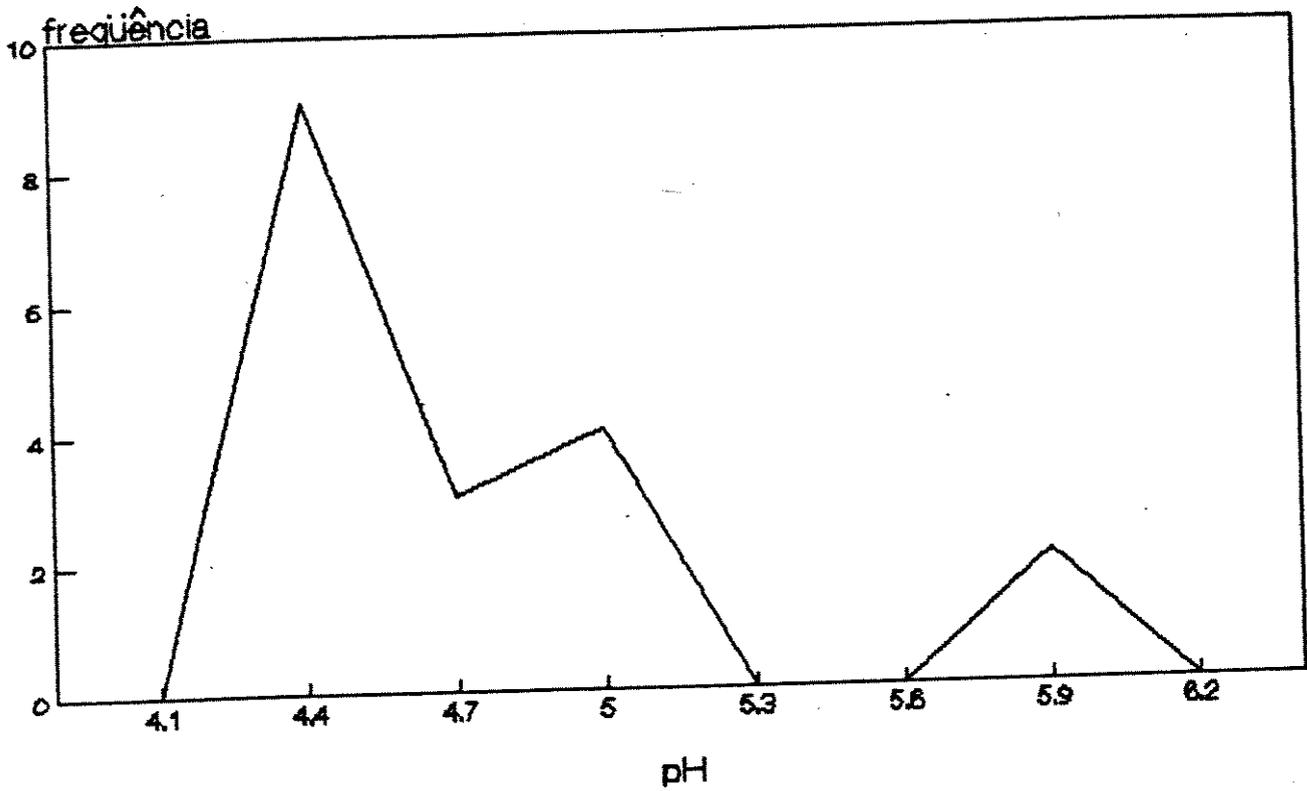


Fig. 24. Distribuição de frequência de calos bege em relação ao pH do meio.

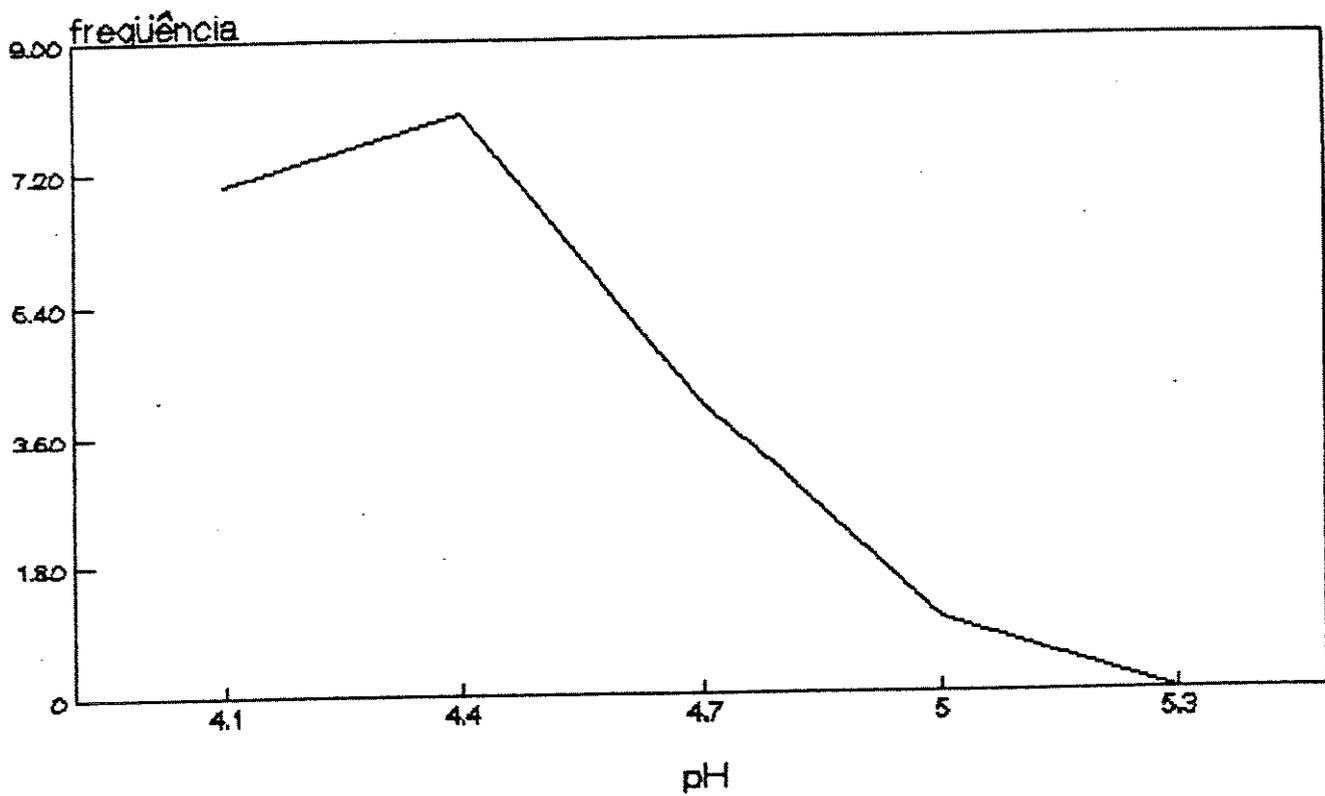


Fig. 25. Distribuição de frequência de calos amarelos e relação ao pH, após dois meses.

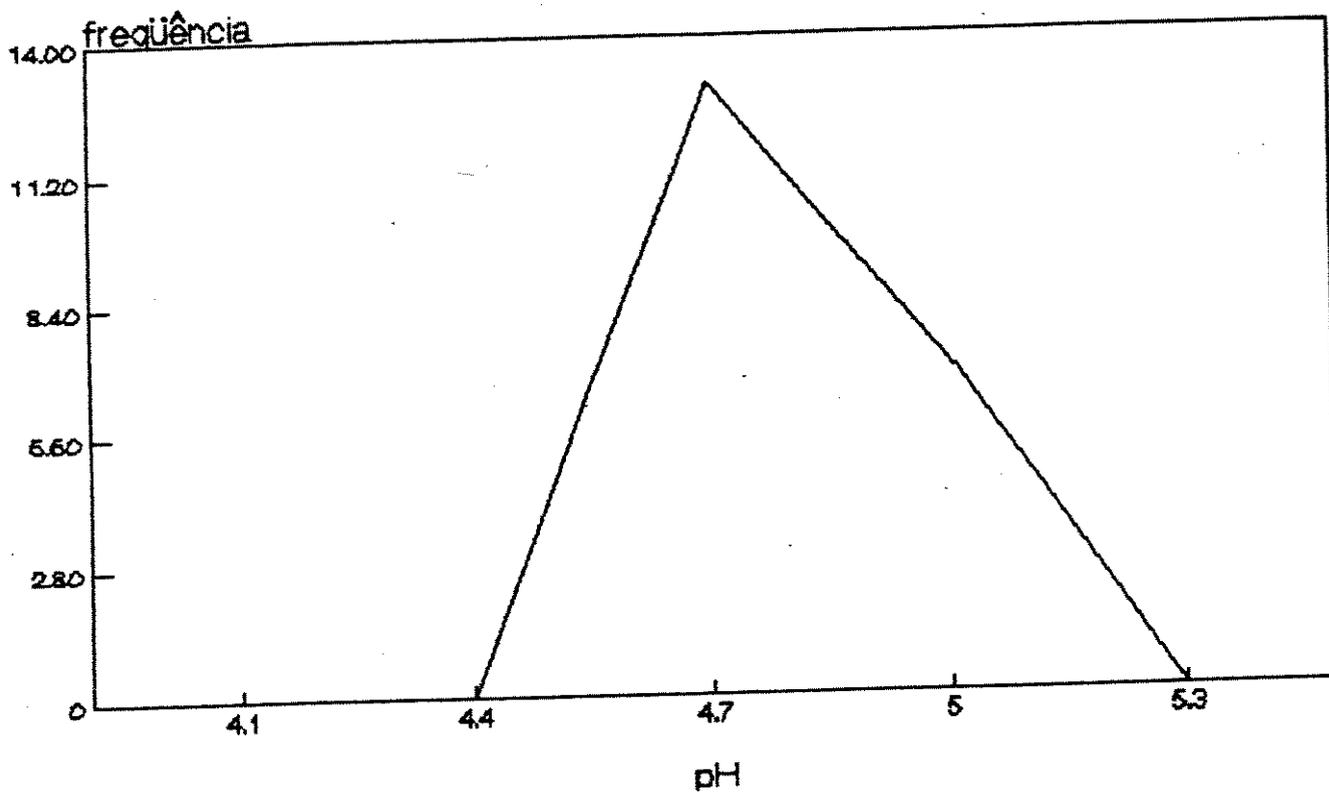


Fig. 26. Distribuição de frequência de calos amarelos em relação ao pH, após dois meses.

II.6 Contaminação bacteriana nas suspensões.

Tanto as observações a fresco, como as coloridas pelo Gram, mostraram tratar-se de bastonetes e não de cocos. Em ambos os casos, foram vistos em sua maioria como formas retas e não curvas e, nas observações a fresco, com um característico movimento peristáltico. Nas transferências, já às 6 h, nos frascos em agitação, começaram a aparecer os primeiros sinais de turbidez, sendo que, após 12 h, esta era intensa, mas, quando os inóculos foram transferidos para frascos sem agitação, a turbidez foi adiada, aproximadamente, para as 72 h.

Quanto à coloração, pelo fato desta ter impregnado intensamente as paredes das bactérias de azul escuro, os bastonetes foram considerados Gram +.

Nas culturas envelhecidas, superior às 24 h, os bacilos começaram a esporular, sendo os esporos, predominantemente mais terminais que centrais, porém, aparentemente com maior frequência de redondos que ovais, sugerindo com isso, se tratar de uma cultura impura. Contudo com base na morfologia externa, caráter aeróbico e forma de esporulação, as bacterias foram enquadrados, provisoriamente, como pertencendo ao gênero *Bacillus* (Davis & Dulbecco, 1979; Bier, 1990).

II.7 Plaqueamento celular e indução de calos.

7.1 Influência do ANA e BAP sobre a indução de calos.

Experimento I.

Nos diferentes tratamentos ANA vs. BAP, foi verificado, sem exceção, uma grande quantidade de microcalos cuja agregação em alguns setores das placas tornaram impossível sua contagem, pelo método proposto, Fig. 30A, 30B e 30C. Os calos apresentaram uma cor amarela clara com aspecto nodular e úmido que cresceram imersos ou superficialmente, mas de qualquer maneira, os superficiais, foram de

maior tamanho, porém, em menor número. Por outro lado, as células que proliferaram sobre o papel filtro, culminaram também com uma grande quantidade de çalos por cm^2 , cuja quantia não foi possível determinar, Fig. 30D.

7.2 Influência do volume da suspensão celular na indução de microcalos.

Experimento 2

Foi observado que o número de microcalos, caiu na medida que a diluição aumentou, assim, para diluições de 6, 12 e 24 vezes os valores médios por cm^2 com seus correspondentes desvio padrão foram: $11,35 \pm 3,5$, $5,7 \pm 1,94$, $3,4 \pm 1,8$ respectivamente.

O tamanho da maior parte desses microcalos flutuou entre 1 a 2 mm de diâmetro e se encontravam dentro do ágaro fundo das placas. Houve também microcalos maiores, cujos tamanhos variaram entre 3 e 5 mm e corresponderam a microcalos desenvolvidos na superfície do agar. Mas, estes microcalos foram em pequeno número por placa, aproximadamente 5, e não entraram na avaliação.

7.3 Verificação da viabilidade dos microcalos em meio MSP, durante o plaqueamento.

Foi verificado que os microcalos correspondentes aos três tratamentos (5, 10 e 20 ml) não apresentaram coloração azul, porém os do controle sim, Quadro 9.

Quadro 9. Teste de viabilidade, usando azul de tripano, sobre microcalos imersos em meio com agar.

Amostras	Reação de viabilidade			
	5(ml)	10(ml)	20(ml)	Controle (Alcool-15min)
1	+++	+++	+++	---
2	+++	+++	+++	---
3	+++	+++	+++	---
4	+++	+++	+++	---

- + não coloração por campo
- coloração azul por campo

A não coloração dos calos correlacionou-se bem com o aspecto externo deles, que foi, sempre amarelo e nunca marrom.

7.4. Efeito do tamanho de placa sobre a indução de microcalos.

Experimento 3.

Como no caso anterior, foram encontrados microcalos no fundo e na superfície das placas, sendo que, os da superfície foram em muito menor número, porém, maiores. No caso dos microcalos imersos, o tamanho deles tanto num tipo de placa como no outro, variou aproximadamente entre 1 e 3 mm, sendo que, no caso das placas grandes o tamanho predominante foi 3 mm, enquanto que, nos das placas pequenas, 1 mm. Os resultados das médias de ambos tratamentos são apresentados no Quadro 10. Verificou-se que as diferenças entre um e outro tipo de placa não foram sensivelmente diferentes, embora, nas placas pequenas existiram repetições com médias algo superiores, elas apresentaram a desvantagem de possuírem desvios padrão maiores.

Quadro 10 Médias do número de microcalos correspondentes a placas de Petri grandes e pequenas.

Tipo de placa	Repetições			
	1	2	3	4
Placa grande (10mm x 100mm)	14,0 ± 5,47 *	10,0 ± 3,69	16,0 ± 2,38	14,0 ± 3,3
Placa pequena (18mm x 50mm)	16,0 ± 3,09	15,0 ± 7,8	18,0 ± 6,73	15,0 ± 3,46

± * (desvio padrão)

7.5. Efeito da superfície do meio e concentração de agar sobre a indução de microcalos.

Experimento 4.

Os resultados mostraram ter havido formação de microcalos, mas, esta foi muito esparsa e rala, além do mais, o tamanho dos microcalos foi pequeno, aproximadamente 2 mm de diâmetro nos maiores. No Quadro 11 as médias de microcalos por cm² são apresentadas.

Quadro 11 Efeito da distribuição da suspensão celular na superfície de meios sólidos com diferentes concentrações de ágar, sobre a formação de microcalos.

Tratamentos Ágar (gr/l)	Repetições			
	1	2	3	4
6	4,0 ± 4,08 *	1,0 ± 1,0	1,0 ± 0,57	2,0 ± 0,96
8	5,0 ± 2,0	2,0 ± 2,31	3,0 ± 3,59	3,0 ± 2,32
10	2,0 ± 2,06	1,0 ± 1,89	2,0 ± 1,71	2,0 ± 2,38

± * (desvio padrão)

Segundo o Quadro 11, as médias por cm² foram muito baixas nos três tratamentos, o que equivale a dizer que a inoculação superficial da suspensão, teve um efeito mais decisivo que a concentração de ágar na formação de microcalos.

7.6 Efeito de diferentes citocininas autoclavadas na indução de microcalos a partir de inóculos de suspensão celular misturado com meio.

Experimento 5.

A indução de microcalos nos três tratamentos, foi muito semelhante, e como tem acontecido anteriormente, a maioria deles correspondeu à forma submersa, Fig. 31A, 31B e 31C. O tamanho variou aproximadamente entre 1 e 3 mm, e sobre o meio, poucos deles se desenvolveram. No Quadro 12, as médias de microcalos por cm² de área, são apresentadas.

Quadro 12 Efeito de diferentes citocininas autoclavadas, na indução de microcalos.

Tratamentos (0,5 mg/l)	Repetições			
	1	2	3	4
BAP	10,0 ± 1,26*	8,0 ± 2,94	8,0 ± 5,12	10,0 ± 5,32
KIN	9,0 ± 2,22	8,0 ± 2,87	9,0 ± 5,12	8,0 ± 4,92
2iP	7,0 ± 4,57	9,0 ± 3,46	9,0 ± 4,2	10,0 ± 1,71

± * (desvio padrão)

7.7. Efeito de diferentes citocininas ultrafiltradas, na indução de microcalos a partir de inóculos de suspensão celular misturado com o meio.

Experimento 6.

Foi verificado que houve indução de microcalos em todos os tratamentos, Fig. 31D, 31E e 31F, cujos diâmetros, em se tratando dos microcalos imersos, variou, aproximadamente, entre 1 a 2 mm, enquanto que, nos de superfície esta variação foi por volta de 1 a 5 mm, mas neste caso, os microcalos foram bem menos numerosos.

Quadro 13 Efeito de diferentes citocininas ultrafiltradas, na indução de microcalos.

Tratamentos (0,5 mg/l)	Repetições			
	1	2	3	4
BAP	12,0 ± 5,06 *	12,0 ± 5,25	13,0 ± 2,81	15,0 ± 7,76
KIN	7,0 ± 2,08	7,0 ± 1,29	7,0 ± 1,71	6,0 ± 1,89
2iP	10,0 ± 3,31	11,0 ± 3,51	12,0 ± 0,82	11,0 ± 2,58

± * (desvio padrão)

7.8. Efeito de diferentes citocininas ultrafiltradas, sobre a indução de microcalos, a partir de inóculos de suspensão celular aplicada via seringa.

Experimento 7.

Foi observada uma grande proliferação e crescimento de microcalos nas placas, Fig. 32A, 32B e 32C, sendo que, já aos trinta dias, estes tinham superado em tamanho e proliferação às colonias celulares dos dois experimentos anteriores, onde, as células tinham-se misturado com o meio, antes deste verter-se nas placas. A proliferação ou agregação alcançou a tal ponto, que se tornou difícil a avaliação através da contagem, razão pela qual esta não foi feita.

7.9. Comparação do efeito sobre o crescimento de calos, entre o método de aplicação por "seringa" e de "mistura" da suspensão celular.

Experimento 8.

Conforme observado aos 45 dias, as placas nas quais a suspensão celular foi aplicada via seringa, os microcalos que mais se desenvolveram foram os de superfície, em troca, no caso da mistura, os calos de superfície foram escassos, e os imersos, predominantes e de pequeno tamanho: 1 a 3 mm de diâmetro como máximo, contra 1 a 5 mm dos de superfície do outro tratamento. Fig. 32D e 32E.

II.8 - Regeneração

Os calos obtidos nos diferentes plaqueamentos, especialmente os crescidos na superfície do meio com ágar, foram os utilizados para induzir regeneração.

Os calos inicialmente, foram colocados em meio MSR-1, como já especificado em I.5.1 de material e métodos para o crescimento dos mesmos. Assim, a partir de um inóculo de 3 a 5 mm de diâmetro, depois de 30 dias, estes haviam alcançado uma massa celular de 10 a 15 mm de diâmetro.

8.1. Indução de brotações através da combinação adenina e 2,4-D.

Experimento 1.

Aos 30 dias, os calos apresentaram um aspecto friável e cor amarela, mas, com pouquíssimos sintomas de brotações, e quando esta se manifestou foi apenas nos casos no qual o 2,4-D esteve ausente, (tratamento 1, 4, 7 e 10).

8.2. Indução de brotações por transferência de calos para concentrações crescentes de adenina.

Experimento 2.

Aos 30 e 60 dias, as brotações não foram abundantes, sendo bem modestas, tanto em número delas como de calos apresentando-as. Mas aos 90 dias, começaram a se evidenciar e já, quando transferidos os calos para MSR-1 novamente, elas tornaram-se exuberantes e homogêneas, apresentando uma cor verde e forma filamentosa mas, estes filamentos não eram erguidos e dificilmente ultrapassaram aos 30 mm de comprimento. As brotações dentro do quarto mês, tinham atingido 70% dos frascos, inclusive, foi possível contabilizar, entre 5 e 10 por calo, Fig. 33A.

8.3. Efeito do amido de milho (maizena), no crescimento de brotações.

Experimento 3.

Aparentemente, não houve diferenças acentuadas entre os efeitos de um meio e outro, Fig. 33B e 33C. De fato, em MSRM, houve 44% de casos com exuberância de brotações (+++), contra 37% em MSR-1. Mesmo no caso de brotações mais ralas (+), não foram constatadas diferenças marcantes entre os dois meios testados, Quadro 14. Mesmo assim, foi selecionado MSM como uma fase transitória para as brotações enoveladas emergentes e curtas de MSR-1.

Quadro 14 Comparação entre os meios MSRM e MSR-1 em relação ao crescimento das suas respectivas brotações.

Frascos (nº)	MSRM	MSR-1
1	++	++
2	+++	++
3	+++	++
4	++	++
5	+++	+++
6	+++	+++
7	+++	+++
8	++	+++
9	++	+
10	+	+++
11	+++	+
12	++	++
13	++	+++
14	+++	++
15	++	++
16	+	++

+++ = Com mais de 5 brotações por frasco iguais ou maiores que 5 cm.

++ = Entre 3 a 5 brotações por frasco iguais ou maiores que 5 cm.

+ = Entre 0 e 2 brotações por frasco iguais ou maiores que 5 cm.

8.4. Efeito do aumento da concentração de açúcar no crescimento das brotações.

Experimento 4.

De acordo com o Quadro 15, ambos tratamentos estimularam o crescimento das brotações, porém, no tratamento com alta concentração de sacarose, houve um maior crescimento (superior a 5 cm) e adensamento, Fig. 33D e 33E. Inclusive, houve frascos (+++) nos quais as brotações foram eretas e de uma cor verde-escura e com visos avermelhados, especialmente na parte distal dos filamentos foliares. Nestes mesmos frascos em geral, havia abundante brotação curta. Por outro lado, no caso dos frascos onde as brotações foram regulares (++) , estas foram predominantemente curtas e não erguidas, e escassamente, sobrepassaram os 5 cm de comprimento. Nesta fase de crescimento, não foi observada presença de bulbilhos. Muitas destas brotações foram isoladas e colocadas em meio MSC para sua manutenção e crescimento, Fig. 33F.

Quadro 15 Efeito de duas concentrações de açúcar sobre o crescimento das brotações: 60 g/l (MSR-60) e 30 g/l (MSR-30).

Frascos (nº)	MSR-60	MSR-30
1	+++*	+++
2	+++	+++
3	+++	+++
4	+++	+
5	++	++
6	+++	+++
7	+++	+++
8	+	++
9	+++	+
10	++	+++

* mesmo significado que Quadro 14.

8.5. Efeito do AgNO_3 sobre a indução de brotações.

Experimento 5.

De acordo com o Quadro 16, no tratamento 1 e 5 não houve indução de brotações, isto é, em ausência de AgNO_3 e na concentração mais baixa deste. Por outro lado, entre o tratamento 2 e 3 tampouco houve diferenças, mas, ambos foram superiores ao tratamento 4, isto tem sentido, porque os tratamentos 2 e 3 corresponderam as concentrações mais baixas que a do tratamento 4.

Com respeito ao aspecto dos calos, estes foram friáveis e apresentaram uma coloração amarela bege e nunca marrons em todos os tratamentos. Apesar deste aspecto saudável dos calos, o número de brotações conseguidas foi baixo, nas concentrações que segundo os resultados obtidos, poderiam ser consideradas como melhores.

Quadro 16 Efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 e adenina sobre as brotações de calos friáveis aos 120 dias.

Tratamento (nº)	AgNO_3 (mg/l)	Total de brotações por tratamento	\bar{X} de brotações por frasco
1	1,25 + ad *	0,0	0,0
2	2,5 + ad	39,0	$5,0 \pm 2,6$ **
3	5,0 + ad	40,0	$5,0 \pm 3,4$
4	10,0 + ad	11,0	$1,0 \pm 1,6$
5	0,0 + ad	0,0	0,0

* = adenina variável

\pm ** = desvio padrão

II.9 Crescimento e bulbificação de plântulas.

9.1 Efeito de diferentes níveis de sacarose sobre a bulbificação.

Experimento 1.

De acordo com o Quadro 17, verificou-se que no meio MSC, uma alta concentração de sacarose favoreceu a bulbificação e a baixa, não.

Fig. 34A e 34B. Nos tratamentos 2 e 3 foram registrados diâmetros de até 6 mm contra 3 mm do controle. Foi constatado também, que o enraizamento nos tratamentos 2 e 3 foi exuberante em relação ao controle, e em geral, a massa foliar também, apresentando de passagem uma cor verde-escura avermelhada.

Quadro 17 Bulbificação de plantas de Chonan sob diferentes concentrações de sacarose.

Tratamento (nº)	Sacarose (%)	% de plantas bulbificadas
1	3,0	20,0
2	4,5	50,0
3	6,0	80,0

9.2 Efeito do AIB sobre a bulbificação.

Experimento 2.

Após 60 dias, foi constatado que houve bulbificação nos alhos de ambos tratamentos, contudo, no caso daqueles que passaram por AIB, apresentaram uma média maior de diâmetro de bulbo: 8,5 mm contra 7,2 mm. Quadro 18. Inclusive, esta bulbificação não apenas foi mais homogênea no primeiro caso, desvio padrão 1,8 e 2,7 respectivamente, como também, o número de bulbilhos acima da média, foi mais alto: 58% contra 41,6%. Embora o crescimento e o nível de enraizamento não tenham sido avaliados, foi notada uma maior resposta destas duas variáveis, nas plantas submetidas transitoriamente a AIB. Fig.34C e 34D.

Quadro 18 Efeito do AIB na indução da bulbificação.

Frasco (n ^o)	MSC-60 + AIB	MSC-60 - AIB
	Diâmetro (mm)	
1	10	10
2	7	3
3	10	7
4	10	12
5	8	3
6	10	5
7	7	6
8	10	8
9	10	10
10	10	7
11	5	7
12	6	8
\bar{X}	8,58	7,16
S	1,88	2,72

As plantas bulbificadas foram repicadas periodicamente em MSC, Fig. 34E, na medida que estas iam secando sua massa foliar, os bulbilhos iam sendo coletados, secos em temperatura ambiente de laboratório, e guardados em saquinho de papel. Fig. 34F. Entretanto, uma das plantas repicadas periodicamente, antes de começar o processo de secamento, foi transferida para o solo, por motivos de contaminação do frasco, nesta nova fase ela se desenvolveu apresentando um fenótipo normal, Fig. 35.

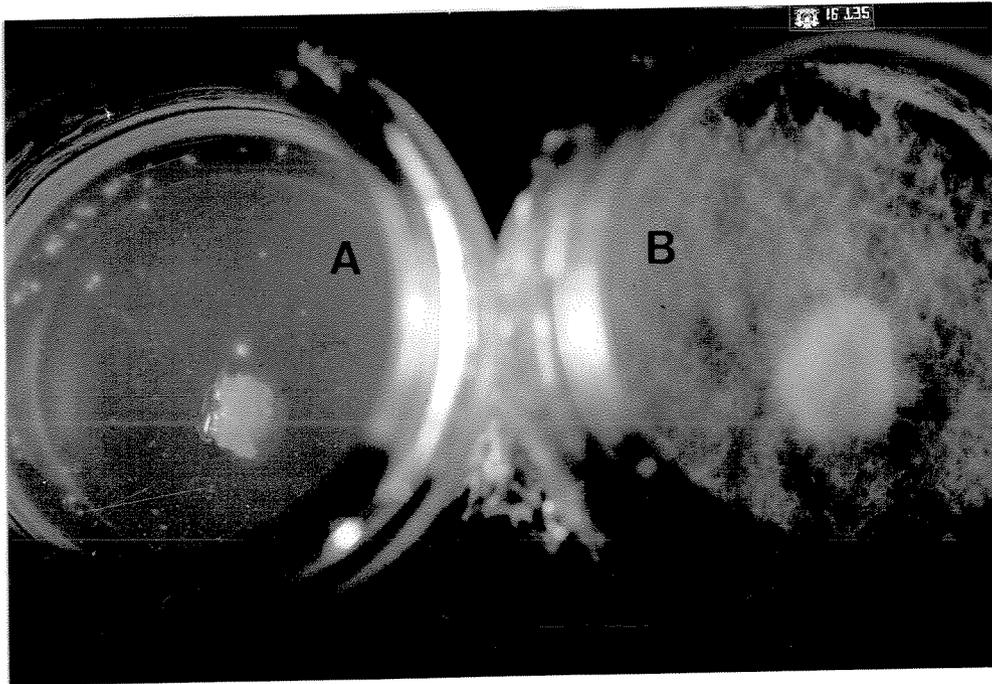


Fig. 27. Efeito do Benlate, aos 15 dias, sobre o crescimento de *Fusarium*. A: 100 mg/l. B: Controle.

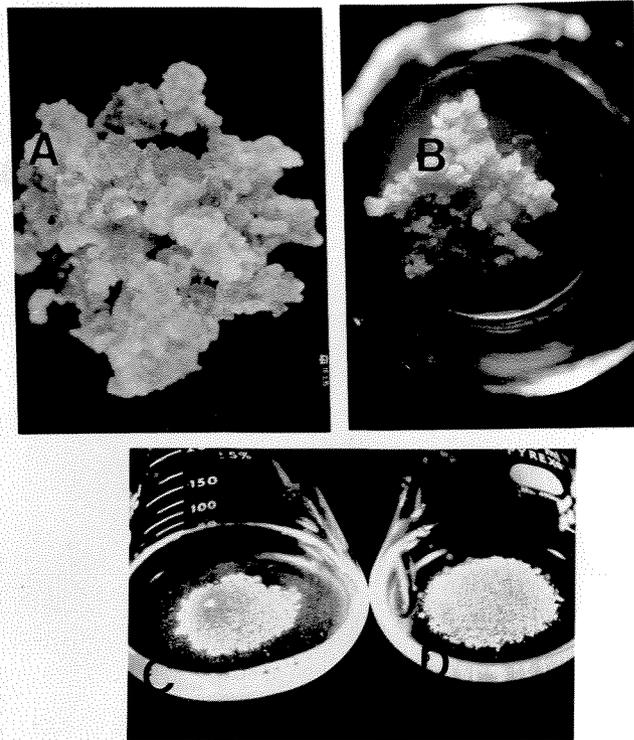


Fig. 28 A Calo chonan clorofiláceo não friável antes de ser submetido ao 2,4-D. B: calo friável após 60 dias e submetido ao 2,4-D, 1 mg/l, com transferência periódicas, em meio MSF C e D: aspecto macroscópico de duas suspensões celulares na fase do platô.

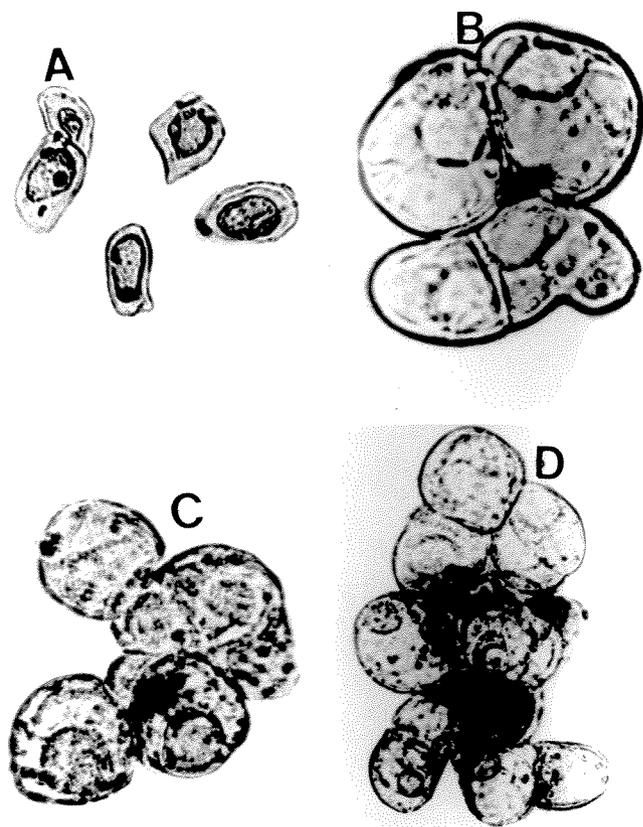


Fig. 29. Aspecto microscópico de células em suspensão em fase de crescimento rápido em meio BC. A: células livres. B C e D: agregados maiores com 4, 8 e 12 células aproximadamente.

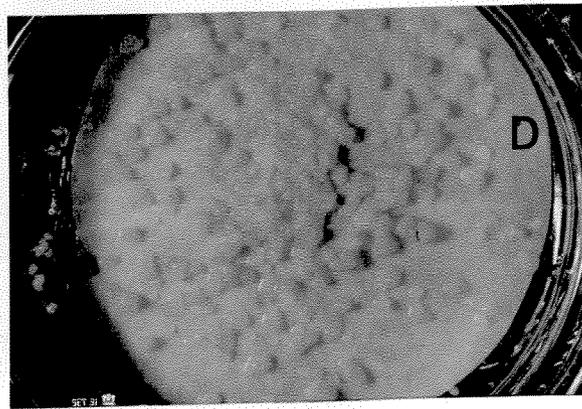
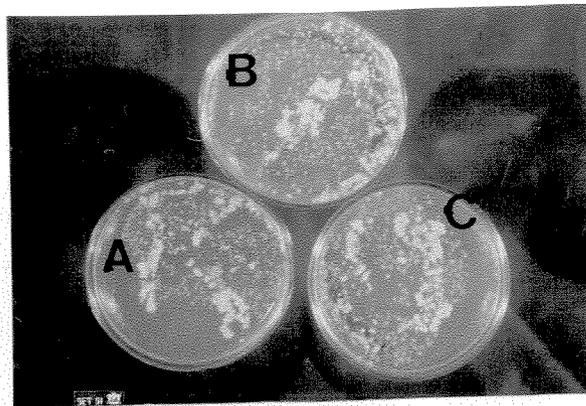


Fig. 30. Plaqueamento celular em meio MSP, aos 45 dias, via seringa e totalidade do meio autoclavado. A: ANA/BAP 0,0 mg/l. B: ANA/BAP 1,0 mg/l e 0,0 mg/l respectivamente. C: ANA/BAP 1,0 mg/l e 0,5 mg/l respectivamente. D: apenas adenina 10 mg/l.

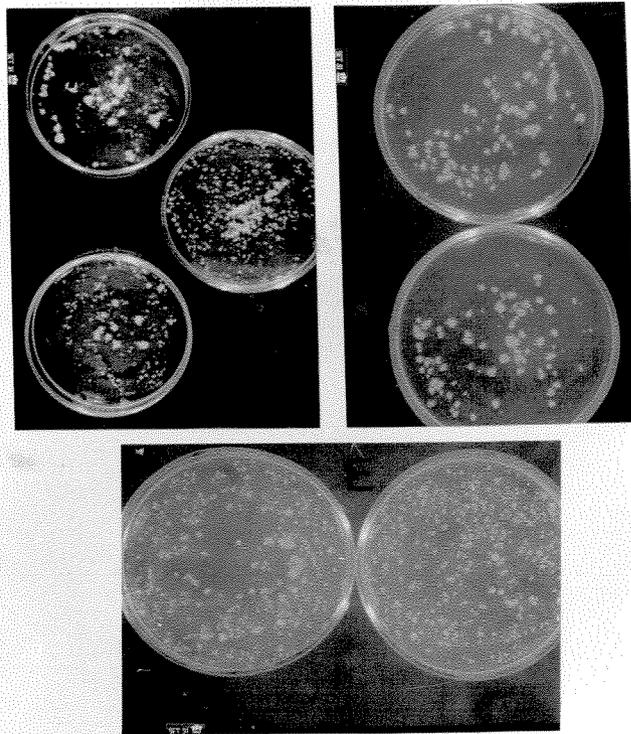


Fig. 32. Plaqueamento em meio **MSP**. A, B e C citocininas ultrafiltradas, contendo BAP, KIN e ZiP respectivamente. Aplicação via seringa. Balanço hormonal (mg/l): ANA/citocinina 1,0 e 0,5 respectivamente. D: indução de microcalos via seringa. E: via mistura. Em ambos tratamentos, a totalidade do meio **MSP** foi autoclavado, sendo o balanço hormonal (mg/l): ANA/BAP 1,0 e 0,5 respectivamente.

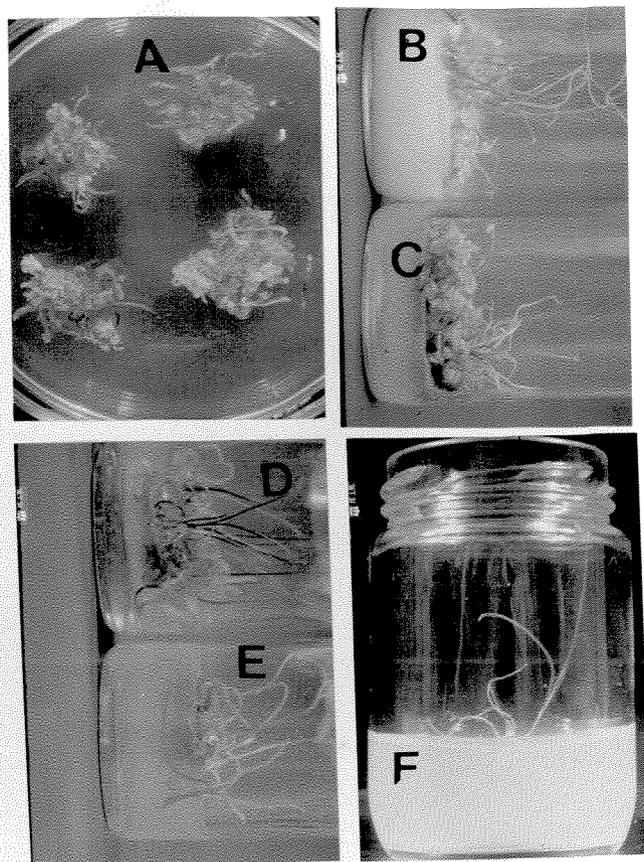


Fig. 33 A: regeneração em meio MSR-1, após os calos ter passado por adenina. B: crescimento das brotações em meio MSR-1 com maizena. C: controle. D: crescimento em meio MSR-1 6% sacarose. E: controle. F: crescimento de brotos isolados em meio MSC.

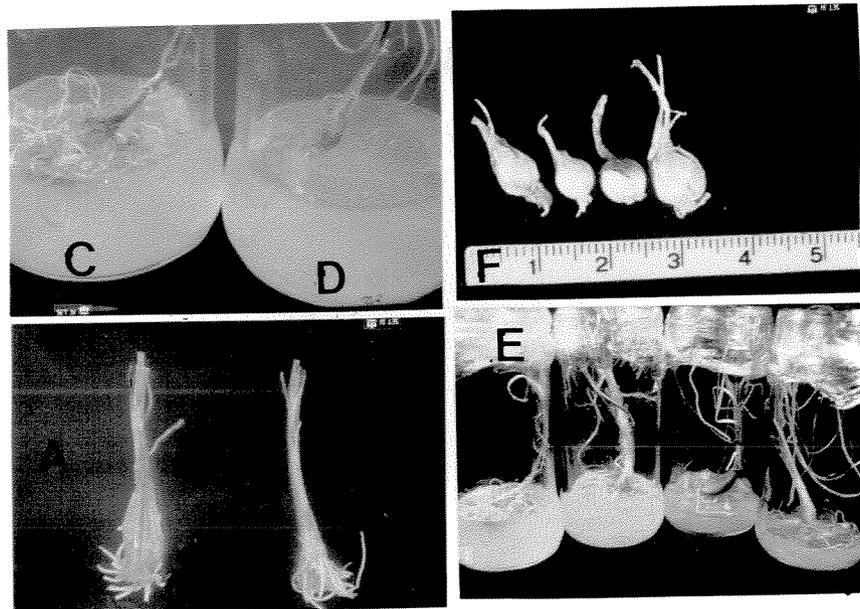


Fig. 34. Aspecto da bulbificação após as plantas ter passado pelos seguintes meios. A: meio MSC 6% de sacarose. B: MSC 3% de sacarose. C: meio MSC 6% sacarose + 3 mg/l AIB. D: controle. E: plantas bulbificadas, após ter passado por C, manifestando sintomas de secamento. F: bulbilhos coletados de E.

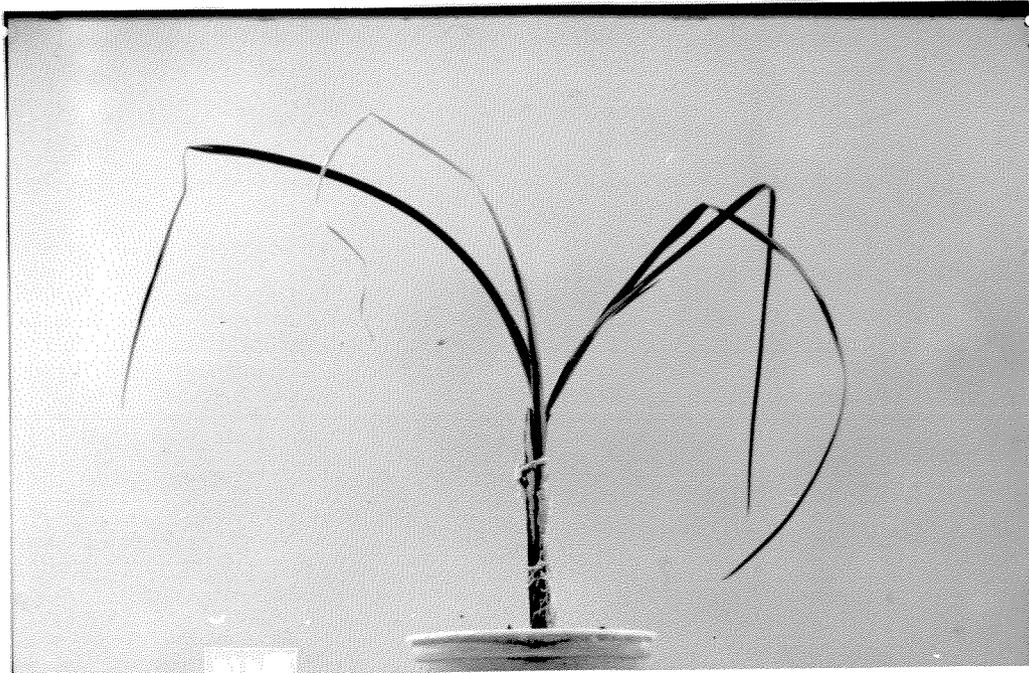


Fig. 35. Planta obtida via suspensão celular, e transferida para solo.

DISCUSSÃO

III.1 Dos experimentos preliminares à suspensão celular

De acordo com Murashige, (1974), na cultura de tecidos é possível identificar 3 estágios, os quais são: estabelecimento da cultura aséptica, multiplicação do propágulo e preparação para o estabelecimento da planta no solo.

Deste ponto de vista, foi lógico que o presente trabalho tenha começado pela assepsia dos explantes na rota explante-calo, visando estabelecer a suspensão celular de alho.

Na literatura (Street, 1977; Doods & Roberts, 1983a) o hipocloreto de sódio (NaClO), na sua formulação comercial de solução aquosa ao 5%, aproximadamente, é recomendado pela sua eficácia contra microrganismos pois, é de fácil remoção e baixo custo. Com base nestes antecedentes, o NaClO foi utilizado para a assepsia dos bulbilhos.

Embora, não tenha sido verificada uma resposta diferencial de contaminação nos três tratamentos utilizados, Quadro 1, conclui-se que nesta fase de desenvolvimento do programa de trabalho o NaClO evitou grandemente a manifestação fúngica dentro dos frascos, coisa que não aconteceu onde ele esteve ausente, pois a percentagem de contaminação alcançou valores de 70% ou mais, contaminação esta, que sempre começou pela base dos bulbilhos.

De outro lado, a julgar pela alta percentagem de germinação (emergência foliar e radicular) conclui-se que a concentração de 50%, em qualquer um dos tempos usados não teve um efeito negativo.

O Quadro 2, demonstra claramente que o colo foi o tipo de explante com maior percentagem de contaminação (70%). Isto não é difícil de entender considerando que dos 5 tipos de explantes, aquele, foi o

único em contato direto com a terra. Também isto demonstra que o NaClO nos diferentes tempos utilizados, teve uma ação superficial e não profunda ou penetrante sobre o tecido do colo, de modo não atingir os esporos maioritariamente de **Fusarium** lá dentro. A contaminação dos outros explantes, em virtude das baixas percentagens, pode explicar-se por contaminação accidental, já que, no começo da dissecação os explantes pertencentes a um mesmo bulbilho estavam numa mesma placa de petri.

O Quadro 2, mostra também embora indiretamente, que as passagens dos explantes, experimento 1.2, pelo Benlate apenas inibiu a germinação dos esporos de **Fusarium**, sem chegar a ter um efeito letal sobre os mesmos, pois, estes sem a presença do fungicida e nas condições nutricionais excepcionais, experimento 1.3, foram capazes de germinar. Isto também sugere, que o Benlate não penetrou ou não foi sistêmico suficiente para atingi-los no interior do colo, pelo menos na concentração utilizada (200 mg/l).

O Quadro 3, foi categórico para demonstrar a ação inibitória do Benlate sobre a estrutura micelial de **Fusarium** nas doses de 100 e 200 mg/l, apesar do produto ter sido autoclavado junto com o meio. Isto demonstra que as condições da autoclavagem não o fizeram perder sua atividade, Fig. 27.

O impacto deste fungicida na célula vegetal não é bem conhecida, embora saiba-se que possa inibir a síntese de RNA, respiração e germinação dos esporos de **Fusarium oxysporum**, (Decallonne & Meyer, 1972) e promover a haploidização em **Aspergillus niger** (Bonatelli et al. 1983).

Levando estes antecedentes em consideração, a dose de 100 mg/l foi selecionada como ingrediente adicional dos meios nutritivos básicos dos explantes, até a formação de calos. Os explantes, na presença de Benlate não manifestaram qualquer sinal externo de fitotoxicidade, pois, mantinham um aspecto branco nacarado e brilhante. A inclusão do Benlate, foi antes de mais nada, uma salvaguarda, porque como já foi

estabelecido, a contaminação apenas foi crítica nos casos onde o colo foi usado como explante.

Em decorrência da lenta indução e crescimento dos calos de BM, a partir dos explantes anteriormente discutidos, foi pensado que calos envelhecidos de BM e Ch, com bastante estoque no laboratório, poderiam servir de base para trabalhos com suspensão celular. Isto aparentemente era uma desvantagem, porque na cultura de tecidos existe o pensamento geral que a idade do calo correlaciona-se negativamente com a capacidade organogênica, em função da instabilidade cromossômica (Novak, 1981; Lee & Phillips, 1988), de fato, os calos vinham apresentando no laboratório uma baixa percentagem de regeneração. Mas, em contra partida a este ponto de vista, na literatura existem referências de calos envelhecidos, terem sido usados como ponto de partida para o estabelecimento de suspensão celular (Takeda & Katoh, 1981, Rennerberg & Kaiser, 1989, Smolenskaya et al., 1989). Mas, mesmo assim, foi considerado necessário testar sua capacidade.

O Quadro 4, mostra claramente esta capacidade, sendo este, maior em BM que em Ch, corroborando o conceito que a regeneração é o resultado não apenas das condições *in vitro* (Murashige, 1974), mas também de um controle genético (Wan et al., 1988).

A adenina, constitui o esqueleto da estrutura cíclica das citocininas, por isso mesmo, é precursora deste grupo de substâncias (Skoog & Miller, 1957). Por outro lado, os anéis das citocininas podem experimentar substituições nas posições 2, 6, 7 e 9, dando origens a derivados sintéticos ou naturais, com maior ou menor expressão morfogênica (Skoog, 1973). Mas no presente caso, é provável que a adenina tenha entrado diretamente na rota biosintética de alguma das muitas citocininas naturais que podem-se formar na célula. Segundo Stuchbury et al., 1979, a adenina ^{14}C , apareceu rapidamente sob a forma de zeatina ((9R-5'P)Z) em tecidos Crown gall de *Vinca rosea*.

A via biosintética das citocininas, não tem sido fácil de estudar devido a sua grande versatilidade para transformar-se de uma forma em outra, sendo que, muitas vezes esta rapidez de transformação não é acompanhada, inclusive, pelas técnicas analíticas mais avançadas. Esta versatilidade é explicada em função de 4 processos bioquímicos que elas podem experimentar, os quais são: conjugação, hidrólise, redução e oxidação, originando diversos tipos de citocininas ((9R-5'P)iP, (9R)iP, (9R)Z, (7G)Z, etc.) ou, precursores das mesmas, nos tecidos da planta (McGaw, 1987).

Do ponto de vista bioquímico, as atividades fisiológicas induzidas pelas citocininas, tais como: divisão celular e regeneração, estariam relacionadas em último termo com a síntese de proteínas, via tRNA, da qual muitas delas formam parte, melhorando ou estimulando a interação tRNA com o complexo ribossomo-_mRNA, (Murai et al. 1977; McGraw, 1987), assim sendo, o cenário bioquímico pos-transcricional estaria facilitado ou adequado para o gatilhamento e desencadeamento das brotações pela adenina. Por outro lado, este alto potencial regenerativo dos calos, apesar da sua idade, sugere pouca alteração cariotípica das células, já que, é conhecido que alterações a este nível reduzem a capacidade morfogenética dos mesmos (Murashige & Nakano, 1967; Kumar et al. 1985).

A tentativa de explorar material foliar *in vitro* para induzir calos Quadro 5, foi pertinente em decorrência dos problemas já mencionados, em relação à indução de calos a partir de explantes de alho *in natura*. Restava apenas a dúvida acerca de que parte dessas brotações era mais eficiente. O Quadro 5, mostra que a parte basal dessas brotações foi mais eficiente em ambos cultivares, sendo o BM, o mais proclive a formar calos, o qual, sugere que neste fenômeno (indução de calos), também houve um componente genético. Por tanto, na eventualidade de não dispor de um tipo particular de bulbilho de alho *in natura*, no laboratório, por tratar-se de uma época fora de estação, esta alternativa, pode ser um caminho a percorrer visando aumentar o estoque de calos desse material ou cultivar.

Com base na alta capacidade morfogenética detectada nos calos envelhecidos BM e Ch, foram estes escolhidos para transformá-los em calos friáveis, pois apesar de seu aspecto vigoroso e saudável (verde claro, Fig. 28A) eles eram compactos e não desagregavam no meio de cultura líquido.

O Quadro 6, mostra o efeito do 2,4-D, através do tempo, sobre a diminuição da clorofila em ambos cultivares, sendo particularmente claro, este efeito na concentração de 1 mg/l aos 60 dias. Entretanto, este efeito inibitório sobre a clorofila, não foi observado por Chia et al., (1988), em calos de *Hedyotis corymbosa* e *H. diffusa* quando usou 2,4-D na concentração de 2 mg/l, porém, outros autores (Berlyn & Zelitch, 1975, Huseman & Barz, 1977) constataram este efeito inibitório da auxina em culturas autotróficas. Mas, parecera que outros fatores tais como: concentração de sacarose, intensidade luminosa e qualidade de luz também estão envolvidadas neste fenômeno (Yamada & Sato, 1978). De qualquer maneira, as transferências periódicas em meio MSF, carente de citocinina (Floh, 1983), converteram estes calos em aclorofiláceos e superfriáveis, Fig. 28B. Mas, como o agitador do laboratório não comportava muita quantidade de erlenmeyers, foi escolhido Chonan para servir de base nos trabalhos de suspensão da presente tese.

III.2 - Efeito de vários fatores sobre o crescimento da cultura primária de Chonan.

2.1 Efeito da combinação 2,4-D/BAP.

Em geral, as curvas de crescimento das culturas primárias, em células não repicadas (Fedoroff, 1967) encontradas nas diferentes combinações de concentração de 2,4-D/BAP, são concordantes com a cinética de crescimento encontrada na literatura (Kubek & Shuler, 1978a; Kirby, 1982), isto é, uma fase estacionária de crescimento, precedida por uma fase ascendente de crescimento, mas, o fato de que estas curvas

não se assemelhassem plenamente a uma curva típica de crescimento (sigmoide), pode explicar-se em virtude de que as medições foram feitas a intervalos regulares espaçados semanalmente, ficando a parte "lag" implícita. Contudo, com intervalos de tempo menores 24 ou 48h, a primeira parte da fase logarítmica ("lag") teria ficado explícita. Entretanto, em outras curvas esta semelhança foi bastante próxima (Fig. 20).

Dentro do comportamento das células de Chonan em meio líquido, Fig. 2 e 5, observa-se que a combinação 2,4-D/BAP de 2,0/0,5 mg/l ou 0.0/0.0 mg/l não foram tão eficazes quando comparadas com as combinações de 0.0/0.5 mg/l, 0,5/0,5 mg/l e 1,0/0,5 mg/l para induzir crescimento da população celular. Do exposto, estabelece-se que qualquer uma destas 3 últimas concentrações poderiam ser usadas para iniciar um protocolo de suspensão celular de alho. Contudo, a combinação 0,5/0,5 foi escolhida por quanto existem indicações de que 2,4-D em faixas fisiologicamente altas pode produzir alterações cromossômicas (Siddiqui et al. 1982; Boucaud et al., 1990), mas no outro extremo, isto é, falta ou uma concentração baixa demais, induzir bloqueio em G_1 , ou, entrada prematura em senescência com lise e morte celular (Balagué et al., 1982; Boucaud et al., 1990) Do ultimamente exposto deduz-se que o 2,4-D é importante para o progresso ou estabilidade da suspensão celular, entretanto, foi surpreendente que na combinação 0,0/0,5, Fig. 2, as células tenham crescido com aquele vigor, apesar da ausência da auxina no meio, mas ainda, historicamente dentro da cultura de tecidos vegetais, a ação da citocinina, foi conhecida interagindo com a auxina em medula de tabaco, onde este tecido foi encontrado ser citocinina dependente para a indução de calos (Skoog & Miller, 1957).

Uma explicação possível ao fato das células de Chonan terem crescido com esse vigor em ausência de auxina, mas em presença de BAP, é que talvez elas tenham-se comportado como BAP-dependentes também. Esta hipótese estaria apoiada pelo fato das células não terem aumentado numericamente na combinação 0,0/0,0 e 0,5/0,0 mg/l, nessas circunstâncias, a citocinina endógena não foi suficiente para manter

altamente ativado o ciclo mitótico da população celular, ou se foi, sucede que em consequência da falta de sincronismo mitótico, apenas uma parte das células da população se dividiram.

Existem evidências de que o teor de citocinina aumenta paralelamente com o ciclo mitótico das células em meio líquido (Nishinari & Syono, 1986), infere-se então, que estes teores endógenos poderiam sustentar algum grau de crescimento ou proliferação, mas, torna-se indispensável adicionar citocinina exógena, para ativar ou tornar mais dinâmico o ciclo, de modo a aumentar a população celular com mais ênfase.

Analisando assim os fatos, poderia formular-se a hipótese de que a falta de auxina exógena conduz às células a pararem no ciclo mitótico, talvez em G_1 , como já foi mencionado, mas que, a presença exógena de BAP torna a célula mais competente, pelo enfraquecimento daquele bloqueio, de modo a não interromper o ciclo celular já "programado fisiologicamente" da maioria da população.

De outro lado, os altos valores de sedimento conseguidos nas combinações 0,5/0,5 mg/l e 1,0/0,5 mg/l, seria um exemplo de dosagem de concentração adequada ou ótima dentro do padrão dose-resposta, em função de um sinergismo fisiologicamente balanceado. Entretanto, é bom precisar que nem todos os autores aceitam este conceito hormonal, proclamando que, a resposta estaria mais em função da sensibilidade das células que de outros fatores (Trewavas, 1981). Como ambas hipóteses admitem o conceito de receptor a nível de superfície de membrana (Cross, 1985), terá que esperar-se mais argumentos experimentais decisivos para resolver esta complexa questão, especialmente do ponto de vista do metabolismo hormonal, onde são encontrados diversos intermediários, conjugados ou análogos destes hormônios (Thimann, 1977).

O problema da senescência no presente trabalho, surge em função de que nos diferentes tratamentos, figuras 2 e 3, as curvas depois de um período definido, entraram num platô, o qual na curva

clássica de crescimento é considerado de declínio das taxas de divisão e começo da morte celular. Dentro do contexto da fisiologia vegetal, este fenômeno tem sido intensivamente estudado a nível de frutos e folhas, onde tem-se observado associada a mudança de cor, taxa respiratória, integridade de membrana, produção de etileno, prolina, etc (Wang et al., 1982; Romani, 1987). Mas a nível de suspensão celular o conhecimento a este respeito é fraco e esparso.

Poderia admitir-se a hipótese de que este fenômeno pode ser consequência da falta ou deficiência de um metabolito (nutritivo ou hormonal), mas como, no presente caso houve renovação do meio nutritivo, pode eliminar-se essa alternativa, porque a acumulação de prováveis produtos tóxicos ou carência de alguns outros, através do expediente da renovação, seriam evitados.

Outra hipótese é a de aceitar para a suspensão celular de alho, existir "longividade programada", ou seja, após um número finito de duplicações estas deixariam de dividir-se para morrer finalmente, isto é, independentemente do seu meio ambiental "in vitro" ou ploidia. Em plantas, parecera que a senescência das células em meio líquido, estivera relacionada com a limitação da síntese de determinados metabólitos (King et al., 1972).

Na área da cultura de células animais e humanas, esta hipótese, também tem sido levantada, especialmente, para células diploides (Hayflick, 1965), entretanto, oposição a ela tem sido apresentada, entre outras razões, porque é admitido que o meio "in vitro" não reproduziria todas as condições "in situ" que as células encontrariam no corpo ou órgão que as aloja (Montes de Oca, 1978).

Esta "longividade programada", de outro lato, conflita com alguns fatos experimentais. Por exemplo, os calos BM e Ch usados neste estudo, são linhas de calos estabelecidas ao redor de 5 anos atrás e na literatura, existem referências de suspensões celulares estabelecidas a partir de calos com quase 30 anos de idade (Rennenberg & Kaiser, 1989) e

suspensões celulares, semanalmente transferidas, desde 10 anos atrás (Balagué et al., 1982), entretanto, relatos de tanta longividade não é frequente na literatura..

Contudo, parecera que sob condições de transferência ou repiques sucessivos, pode-se conservar ou estabelecer uma linhagem celular por muitos anos, talvez, por tratar-se de células em ativa divisão (fase exponencial) com seu aparelho biosintético e mecanismo gênico intacto ou suficientemente incólume para manter a "homeostase" celular em dia. No caso da combinação 0,0/0,0 mg/l, as células, não responderam favoravelmente, a partir da quinta semana, fase estacionária, quando a renovação do meio foi feita com meio BC 0,5/0,5 mg/l, não observando-se aumento do diâmetro do sedimento celular, nem à sexta, sétima ou oitava semana de observação. É possível que a essa altura dos acontecimentos (quinta semana), as células tenham experimentado algum grau de alteração na sua permeabilidade celular, e, concomitantemente a isso, saídas importantes de metabolitos tais como: amino-ácidos (Balagué et al., 1982) ou enzimas (Chibbar et al., 1984; Berger et al., 1988) ou, experimentado tal processo de diferenciação, lignificação por exemplo, ou modificação morfológica, incompatível com a reentrada das células no ciclo mitótico (Arnison & Boll, 1976).

Células na fase estacionária, no presente trabalho, não foram observadas ao microscópio, apenas na fase exponencial do tratamento 0,5/0,5 mg/l, e o que foi observado, foram células isodiamétricas livres ou agrupadas, e raras vezes células tubulares ou enroladas (coiled) Fig. 29. De acordo com Vasil (1985), o primeiro tipo de célula é menos susceptível a experimentar alterações cromossômicas, enquanto que o segundo é mais proclive.

Durante o período final de observação, 5ª semana, a cor do meio foi em geral transparente e límpido, não observando-se no sedimento celular uma cor marrom que sugerira algum grau de oxidação fenólica, Fig. 28C e 28D, fenômeno este, que pode dificultar ou inviabilizar a cultura em meio líquido. Tal como tem acontecido em *Pinus contorta* (Grey

et al., 1987). De acordo com Shah et al., 1976 em *Cassia fistula* altos níveis de fenóis foram detectados com baixos níveis de 2,4-D e vice versa, um similar comportamento, foi verificado para a atividade de peroxidases, sendo que, a produção de fenóis foi essencialmente restringido à fase rápida de crescimento.

Com respeito às de TCR, na literatura da cultura de tecidos, referências sobre esta questão não são encontradas, por isso, se torna difícil discutir ou estabelecer paralelos. Entretanto, o que foi claro é que as células começam mostrando uma alta TCR e terminam com um valor zero ou perto dele. Na prática, isto quer dizer que a capacidade de suspensão celular para incrementar o número de células através do tempo, foi perdendo-se, até chegar à fase estacionária, onde o ganho líquido foi simplesmente nulo.

Nas Fig. 3 e 6, este fenômeno foi geral, mas, chama a atenção o comportamento celular de 2,4-D/BAP, na dose 0,0/0,5 mg/l, onde este fenômeno foi observado de uma maneira mais gradual que em outros casos, inclusive, observou-se que a TCR começou a declinar pronunciadamente a partir da quarta semana, enquanto que as outras doses, o faziam à segunda semana.

Uma outra questão que chamou a atenção, foi o fato que enquanto os valores iniciais dos TCR da primeira semana, mostraram valores diferentes, Fig. 3, as TCR das doses mais crescentes de 2,4-D/BAP, Fig. 6, praticamente apresentaram valores iniciais uniformes. Talvez, no caso da Fig. 3, isto sugere uma falta de uniformidade ou sincronismo, quanto ao ciclo mitótico nas diferentes populações celulares, apesar de todas terem origens numa mesma fonte de inóculo.

Com relação ao pH, este mostrou tanto na Fig. 4 como na Fig. 3, valores diferentes ao longo do tempo. Esta tendência, no geral, concorda com o registrado na literatura, no sentido que este não permanece fixo, senão pelo contrario, experimenta variações (Gamborg & Shyluk, 1970; Veliky & Rose, 1973).

Esta variação, é explicável em função de que a célula não é um sistema isolado e trocas com o meio líquido, devem existir, em consequência disto, cátions e ânions, bem como, prótons e oxidrilas são intercambiados.

Em *Pyrus communis* e *Malus sp* foram observados que os níveis de vários cations (K, Ca, Fe, NH_4 , etc) bem como de alguns anions (fosfato) diminuíram sua concentração no meio nutritivo, (Balagué et al., 1982, Singha et al., 1987), com fortes reflexos na variação de pH, conforme o tempo transcorria (Singha et al., 1987). A intensidade com que este fenômeno de trocas, aconteceu, em último termo, determinou as mudanças de pH, mudanças estas que refletiram diferentes necessidades nutricionais ou estados fisiológicos das células. Isto, talvez explique as diferenças de comportamento das células, relação 2,4-D/BAP, nas doses de 0,5/0,5 mg/l 1,0/0,5 mg/l, Fig. 7, apesar de ambas populações celulares apresentarem curvas de crescimento praticamente iguais.

As mudanças de pH entre as Fig. 4 e 7, podem ser explicadas em função de fluxos e efluxos de ions entre as células e seus respectivos meios, fenômeno este que tem sido constatado e estudado através da equação de Nerst (Bidwell, 1979b).

A partir da Fig. 4, pode-se estabelecer dos momentos de requerimentos nutricionais diferentes das células. No primeiro, pH abaixando, as células teriam um maior requerimento de cátions, e no segundo, pH subindo, uma maior demanda por ânions. Isto sugere, que na fase de crescimento rápido das células, estas foram mais requerentes de cations e na fase estacionária de ânions, porém, isto não foi um fenômeno geral, já que na Fig. 7, nas doses 0,5/0,5 mg/l e 2,0/0,5 mg/l de 2,4-D/BAP, o padrão de variação de pH foi diferente, o qual, reflete o grau de dificuldade ou complexidade de interpretação destas inter-relações, como por exemplo, na formação de carbamatos (Durzan, 1987), ou, na interação prostaglandina e potencial elétrico de membrana (Yurin, 1991).

2.1.1 - Medição do crescimento da população celular.

Na literatura relacionada, com a suspensão celular, existem diferentes procedimentos para monitorar o crescimento do número de células ou biomassa celular.

Exemplos de alguns destes procedimentos são: contagem de células e determinação de proteína total (King et al., 1972), densidade óptica (Kubek & Shuler, 1978a), peso seco (Kirby, 1982), peso fresco (Zink, 1989), etc. Mas, todos estes métodos são destrutivos e/ou demorado. No caso de contagem de células, por exemplo, estas devem ser submetidas a ácido crômico, no qual, concentração e tempos (12, 24 h, etc) devem ser estabelecidos previamente, para atingir um grau de maceração compatível com a contagem (Butenko, 1964c; Street, 1977) mas, mesmo assim, este método não avalia ou não leva em conta o número de células destruídas pela maceração mecânica e química.

Numa outra alternativa, a incorporação de enzima + estabilizador osmótico (King et al., 1972) ou, a incorporação adicional de EDTA no meio (Werry & Stoffelsen, 1978), tem sido procedimentos empregados visando facilitar a contagem. Contudo, sob nossas condições de laboratório, a obtenção destas enzimas, não é um procedimento fácil e barato, enquanto que, a incorporação de quelantes, não produziu resultados tão consistentes (Werry & Stoffelsen, 1978) ou, mesmo que fossem, tanto neste caso, como anterior, a incorporação de tais produtos ao meio nutritivo, representaria um risco cujo impacto não poderia deixar de ser avaliado, antes de proceder a sua adaptação.

A suspensão celular de Chonan, apresentou poucas células livres e mais presença de agregados, Fig. 29, compartilhando desta forma, uma característica que é geral neste tipo de cultura, em decorrência de que as células uma vez terminada sua telófase, não se separam ou apresentam pouca tendência a fazê-lo (Fowler, 1984; King,

1984). Isto parecia estar ligado ao fato que a parede celular das células em suspensão, é rica em pectina (Grey et al., 1987) a qual, pode estabelecer ligações de cálcio, permitindo a formação de uma "trama de fios" na região do fragmoplasto que evitaria a separação das células.

Na suspensão celular de Chonan, estes agregados, foram persistentes e claros, a tal ponto que, a agitação normal dos erlenmeyers, permitiu a formação de um sedimento perfeitamente circular e compacto, cuja cor amarela ia-se tornando mais evidente, conforme o tempo transcorria e o tamanho do diâmetro aumentava. Foi esta propriedade, formação de sedimento, que foi utilizada para acompanhar o crescimento da suspensão. Este procedimento, não tem sido registrado na literatura e o tratamento estatístico dos dados, revelou um baixo desvio padrão e coeficiente de variação, sugerindo com isso, uma alta uniformidade na tomada dos dados, isto é, nas medições dos diâmetros dos sedimentos. Comparados com os outros métodos, este resultou ser rápido, fácil, prático e não destrutivo, ao mesmo tempo que, serviu para identificar a região logarítmica de crescimento, dado este importante, para proceder às transferências dos inóculos.

Naquelas culturas, cuja tendência a formar este sedimento não seja nítida, é claro que este procedimento não se poderá utilizar mas aí, a opção deverá ser feita, por qualquer um dos métodos já mencionados.

2.2 - Efeito do MES

Conforme foi discutido no item anterior sobre pH, entre as células e o meio se produz uma relação biunívoca, quanto à troca de íons. Estas mudanças na composição iônica do meio, sem dúvida, mudam seu pH. De outro lado, sabe-se que a solubilidade dos elementos varia com a acidez do meio, do mesmo modo, que alguns elementos são mais absorvidos que outros em função do balanço externo de H^+ e OH^- (Thompson, 1965). O pH, também pode afetar a estabilidade da glutamina ou ainda, promover

vitrificação (Sigma, 1991; Williams et al., 1990).

Para tentar evitar estas mudanças de pH, é que na cultura de tecidos "in vitro", em geral, tem-se apelado para o uso de tampões, os quais, no caso da cultura de células animais e humana é uma norma (Primrose, 1987), porém no caso das culturas vegetais, estes são opcionais.

No presente caso, foi usado MES para evitar as mudanças de pH e concomitantemente a isto, avaliado seu impacto no crescimento da população celular. Foi usado MES, porque abrange uma faixa de pH entre 5,5 e 6,7 com pK' 6.1.

De acordo com a Fig. 10, houve uma diferença de pH inicial (primeira semana) entre o controle (0,0 g/l) e os tratamentos com MES (0,5 g/l e 1,0 g/l). Considerando que o pH de ajuste do meio antes da esterilização foi 5,8, na ausência do tampão, (controle), a queda foi mais sensível neste que nos outros 2 tratamentos, após a autoclavagem e da mistura dos sais MS com as vitaminas e hormônios, conforme foi relatado em material e métodos (I.3.5).

A descida do pH após autoclavagem do meio nutritivo (5,8 para 5,2) e ainda, após a adição da parte orgânica (5,2 para 5,0) foi um fenômeno frequente no laboratório mas, pelo apreciado na Fig. 10, o tampão resistiu a esta queda inicial, coisa que não aconteceu no controle, onde foi observado uma queda de 0,4 unidades de pH enquanto que nos meios tamponados apenas de 0,2 unidades.

Entretanto, nos três tratamentos ao longo do tempo, houve um padrão de variação de pH muito similar, isto é, uma queda, embora mais drástica no controle, seguida de uma elevação gradual de pH. Este padrão já foi registrado (Fig. 7), e na literatura também tem sido mostrado (Martin & Rose, 1976; Ruyack et al., 1979; Singha et al., 1987). Esta variação de pH poderia estar relacionada com a absorção de íons, acidificação do meio, através do CO_2 respiratório, ou, mais

especificamente, com a relação NH_4^+ vs NO_3^- , sendo que a depleção do primeiro, abaixaria o pH e a do segundo, o aumentaria (Singha et al., 1987; Williams et al., 1990). Entretanto, em qualquer uma das alternativas, o certo foi que o tampão nas concentrações usadas, não foi capaz de estabilizar o pH. Se comparadas estas concentrações com os apresentados na literatura, por exemplo: 5,86 g/l (Koyama et al., 1990) e 19,52 g/l (Banthorpe & Brown, 1990) se constata que no caso de Chonan estas foram bem mais inferiores. Contudo, no caso de 5,86 g/l, não foi observada uma estabilização do pH no meio líquido da suspensão celular, enquanto que na dose de 19,52 g/l, sim foi, mas, o efeito não foi superior ao controle em relação ao aumento de peso seco ou produção de metabólitos secundários (Banthorpe & Brown, 1990). Em Chonan, é possível que concentrações mais altas tivessem um efeito mais estabilizante, porém, existe o problema de toxicidade.

Da comparação das Fig. 8 e 10, na primeira semana, estabelece-se que o platô observado na Fig. 8, foi paralelo à queda de pH, da Fig. 10. Deduz-se então, que na primeira semana deve ter havido uma forte absorção de alguns cations (NH_4^+ ?), para facilitar o "arranque" das curvas na segunda semana. Isto é concordante com a alta TCR da segunda semana, Fig. 9. De outro lado, a estabilidade das curvas de crescimento, se deu de forma paralela ao incremento dos pH por um lado, e queda das TCR por outro. Contudo, as curvas de crescimento no qual o tampão esteve presente, o crescimento se estabilizou num valor mais alto que o correspondente ao controle, inferindo-se disso, que houve uma maior densidade de células e que não houve efeito tóxico, porém, esta diferença de tamanho de diâmetro, talvez, não justifique o uso deste produto importado e por isso mesmo, mais caro.

Do exposto até aqui, conclue-se que a flutuação de pH na cultura líquida é um fenômeno quase natural e inevitável porque forma parte da interação mútua da célula com seu meio, da mesma forma como a raiz interage com o solo (Thompson, 1965).

A vantagem no uso do tampão talvez esteja na manutenção do pH inicial próximo de 5,8 após a autoclavagem, para tornar a queda deste na primeira semana, mais gradual, isto é, conduzir as trocas de íons de uma maneira mais moderada, e foi na verdade, o que parece ter acontecido. Assim, enquanto o pH do controle caiu perto de 4,3 os outros pH caíram próximo de 4,8, Fig. 10, daí que, a fase exponencial de MES 1,0 g/l tenha sido mais inclinada, Fig. 8, sugerindo uma maior atividade mitótica.

2.3 Efeito do rifaldin

Durante as etapas preliminares relacionadas com o estabelecimento da suspensão celular em meio líquido, problemas com a contaminação bacteriana surgiram e dúvidas com respeito às origens desta contaminação existiram, porque esta pode ter-se originado por: contaminação endógena dos calos friáveis, sendo que neste caso, as condições do meio líquido seriam mais propícias que as do meio sólido, ou, por manipulação das células durante a renovação periódica do meio. Pelo fato de ter-se superado esta contaminação, foi conjecturado que esta última foi a causa mais provável desta grave dificuldade. Mas, como o surgimento deste problema foi aleatório e pode aparecer repentinamente no decorrer de um experimento, foi incluída na programação do protocolo, um estudo preliminar do comportamento das células frente a um antibiótico, de modo a servir de orientação a futuros trabalhos de alho na área da cultura de células em meio líquido, mas, dentro de uma perspectiva mais profilática que terapêutica, isto é, uso de baixas concentrações, incluídas no meio nutritivo, visando mais prevenir que curar.

Foi escolhido o antibiótico rifaldin por ter a rifampicina como princípio ativo, cuja ação se caracteriza pela formação de um complexo estável com a subunidade β de RNA polimerase, das células procarióticas, porém, não com as eucarióticas impedindo dessa maneira, a formação de RNA (Lehninger, 1974) e por isso mesmo, com um espectro de

ação mais ampla que outros antibióticos (Young et al., 1984)

As curvas de crescimento obtidas nas diferentes concentrações de rifaldin, Fig. 11, ao igual que as observadas a partir das diferentes concentrações de MES, Fig. 8, apresentaram muita semelhança com a curva de crescimento sigmoideal, curva esta apresentada como sendo ideal na literatura fisiológica (Salisbury & Ross, 1985c). Ideal porque a partir de dados experimentais, raramente se consegue o perfil típico dela, isto é, identificações claras das diferentes regiões do mesmo. Mas, neste caso como no caso do MES, o início da parte logarítmica, identificada como fase "lag" pela literatura (Street, 1977) está muito clara, especialmente na dose de 20,0 mg/l de rifaldin, onde esta fase se apresenta muito estacionária (1ª semana).

Sendo que, nas outras concentrações, o comportamento das curvas no mesmo período, não foi plenamente horizontal, e sim, mais inclinado, especialmente nas concentrações de 5,0 mg/l e 10,0 mg/l os quais foram estatisticamente diferentes com relação a 20 mg/l mas, não com relação ao controle.

Na fase ascendente das curvas as diferenças estatísticas em relação ao controle, foram variáveis aparecendo e desaparecendo segundo a semana considerada, revelando pouco ou nenhum efeito tóxico por parte do antibiótico.

No começo da fase estacionária, quarta semana, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos e já, em plena fase estacionária, quinta semana, todos os tratamentos foram iguais exceto 10,0 mg/l que foi diferente de 20,0 mg/l. Em outras palavras, não houve evidência experimental nas doses de rifaldin, que revelassem um efeito inibidor sobre o crescimento das células, exceto apenas na concentração de 20,0 mg/l na primeira semana, onde as células desta concentração aparecem entrando com atraso na fase ascendente da curva. Isto, inclusive concorda com a Fig. 12, onde observa-se que a TCR correspondente a esse período, foi a mais baixa.

Com relação às TCR, verificou-se o que já foi visto anteriormente, apresentam um aumento até a segunda semana, para depois, começar a declinar o valor máximo das taxas. A Fig. 12, concorda com o Quadro 5 do Apêndice IV, no sentido que os maiores incrementos no diâmetro dos sedimentos, foram registrados entre a primeira e segunda semana de cultura, e justamente por isso, no mesmo apêndice Quadro 6, as diferenças de valores para este mesmo período em todos os tratamentos, foram estatisticamente diferentes.

No tocante ao pH, Fig. 13, este repete o já visto nos casos anteriores de queda e subida, e chama a atenção a quase uniformidade da variação do rifaldin, nas doses de 0,0 mg/l, 5,0 mg/l e 10 mg/l ao longo do tempo, e a marcada diferença de pH da concentração de 20 mg/l com o resto dos tratamentos, a partir da segunda semana, mas mesmo assim isto não foi obstáculo para impedir o crescimento das células, sugerindo com isso, que estas faixas de pH são compatíveis ainda com o crescimento das células em meio líquido. As doses usadas nos quatro tratamentos (0,0 mg/ml, 5,0 mg/ml, 10,0 mg/ml e 20,0 mg/ml) foram bastante aquém em relação às encontradas na literatura: 50,0 mg/ml (Phillips et al., 1981), 100,0 mg/ml (Young et al., 1984), as quais, foram usadas com uma finalidade terapêutica. Entretanto o objetivo no presente protocolo, foi encontrar doses profiláticas sem detrimento final do crescimento da população celular, portanto, sugere-se a concentração de 10,0 mg/l (10mg/ml) ou uma faixa de 10 a 20 mg/l como níveis possíveis a serem utilizados. Contudo, deve ter-se presente que o uso de um antibiótico não deve substituir a obrigação de uma assepsia rigorosa e acurada de trabalho, porque, os antibióticos atuam como faca de dois gumes, por um lado curam, mas pelo outro, podem produzir efeitos negativos: como fitotoxicidade ou resistência, por isso, na cultura de tecido em geral sempre são usados como último recurso (Falkiner, 1990). Entretanto, é oportuno mencionar que também um antibiótico, kanamicina, pode promover morfogênese em planta (Owens, 1979), contudo, isto não tem sido um fenômeno frequente na literatura.

2.4 Efeito de diferentes fontes de sacarose.

A sacarose é a fonte de carbono usada nos meios nutritivos, mais frequentemente utilizados nos laboratórios de cultura de tecidos de plantas. Paralelamente a isto, ela é o ingrediente que entra em maior quantidade na composição dos mesmos. Assim, em MS o recomendado é 30,0 g/l, em B5 20,0 g/l e em ER 40,0 g/l (Gamborg & Wetter, 1975).

Em decorrência da maior ou menor atividade de um laboratório, a sacarose PA pode chegar a constituir-se num fator limitante em função de custos, pelo seu uso massivo e reiterado.

Levando este problema em consideração, foi que se comparou o crescimento das células em meio líquido com sacarose PA e não PA, visando poder substituir a primeira pela segunda.

De acordo com a Fig. 14, as duas curvas correm aproximadamente paralelas desde o começo até o final, ainda mais, as médias dentro de cada uma das semanas, não apresentaram diferenças estatísticas. Isto implica reconhecer que a sacarose não PA, foi uma boa fonte de carbono para as células e que não houve qualquer efeito tóxico ou depressivo sobre o crescimento de população apesar de seu grau de impureza. Talvez o fato de ter sido filtrada com papel Whatman previamente, tenha contribuído para isto, mesmo assim, este expediente não teria sido suficiente para eliminar a presença de elementos tais como chumbo, arsênico, enxofre, ferro, etc, no caso deles estarem presentes em doses altas. Contudo, a transparência do meio líquido foi semelhante com a do meio de sacarose PA, sugerindo com isso, pouca lise celular, e pouca ou nenhuma, ação tóxica.

Com respeito a presença transitória de pigmentos avermelhados em alguns frascos de ambos tratamentos, pode ser considerada como uma manifestação epigenética de difícil interpretação pela falta de elementos no presente trabalho, para sua caracterização.

No tocante ao metabolismo da sacarose na literatura, este tem sido amplamente pesquisado em função das enzimas envolvidas: invertase ácida, invertase alcalina e sacarose sintetase (Giaquinta, 1977; Kanabus et al., 1986; Masuda et al., 1988). Entretanto, na literatura fisiológica a discussão está aberta com respeito a se a sacarose é previamente hidrolisada a nível de apoplasto pela invertase ácida (β -frutofuranosidase), ou, penetra como tal pela plasmalema (Wyse, 1979).

Na cultura de células em meio líquido, as evidências favorecem a primeira alternativa (Schmitz & Lorz, 1990a) e descarta-se a possibilidade que a presença de glicose e frutose no meio, sejam unicamente produtos da autoclavagem, porque a hidrólise por esta via tem registrado valores de 2,1% da sacarose total (Dubois et al., 1988) ou 15% (Singha et al., 1987). Apoiam a hipótese da hidrólise enzimática, o fato que tenha-se detectado invertase no meio nutritivo (Maretzki et al., 1971; Kanabus et al., 1986) e a circunstância de que, conforme a sacarose foi desaparecendo, paralelamente a frutose e glicose aumentaram equimolarmente no meio líquido (Singha et al., 1987).

Existem evidências de que o pH do meio não é alheio à esta questão, já que com pH inicial perto de 5,0, a sacarose desapareceu do meio após 150 h, em troca, a pH 7, ela não desceu substancialmente do meio nutritivo (Martin & Rose, 1976) indicando com isso, uma baixa atividade da invertase. Por outro lado, em diferentes cultivares de *S. tuberosum* foi visto que a enzima apresentou diferentes K_m , conforme o pH utilizado (Bracho & Whitaker, 1990).

Com respeito às diferenças de pH, Fig. 16, estas podem ser atribuídas à diferente composição da sacarose não PA, o que talvez influíu numa troca de íons de tal natureza e intensidade que terminou acarretando uma maior descida. Contudo, a quase estabilidade do pH na faixa de 4,3, na curva de sacarose não PA, por um lado, e por outro, um alto crescimento celular no mesmo período, Fig. 14, sugerem uma atividade enzimática por parte da invertase, não muito afetada por

aquele pH. Também, a elevação do pH na curva do açúcar PA a partir da terceira semana, permite especular sobre uma maior atividade enzimática da invertase, pelo fato de que o crescimento correspondente, Fig. 14, alcançou um diâmetro de sedimento celular de 49 mm contra 43 mm da não PA. Isto concorda com o verificado na literatura (Bracho & Whitaker, 1990) no sentido de que a invertase apresenta uma maior atividade de catálise a pH 5,0, e menor, abaixo de 3,3 e acima de 6,7.

No tocante às TCR, Fig. 15, à segunda semana, verificaram-se, menores valores em relação às TCR de experimentos anteriores, porém, a queda gradual e não brusca a partir desta semana, seja uma explicação para o fato de que neste experimento, tenham-se alcançado maiores diâmetros de sedimento celular. Por outro lado, o fato que a TCR correspondente à segunda semana houvesse sido mais elevada, no caso das células com sacarose PA, pode atribuir-se a que a invertase encontrou melhores condições de pH para sua atividade catalítica, mas que, a partir da terceira, as células já começaram a diminuir sua atividade metabólica (Apêndice V, Quadro 5) e conseqüentemente a diminuir sua produção de invertase por razão de envelhecimento (Maretzki et al., 1971), independente de que o pH à quarta ou quinta semana, houvesse sido mais favorável para ela.

A incorporação de carboidratos à células, não pode ser focalizada somente a partir da invertase, já que, a complexidade metabólica da célula é muito mais ampla, contudo, e apenas como referência, cabe mencionar que a incorporação da glicose à célula segundo alguns autores, segue uma curva hiperbólica de saturação com Km que entre 10 a 30 mM, e que para frutose, este valor foi de 80 mM (Schafer & Heber, 1977). Estes antecedentes sugerem a participação de transportadores a nível de membrana (Stommel & Simon, 1989) que podem pautar seu comportamento, pelo grau de aptidão fisiológica da célula nas distintas fases da curva de crescimento, neste caso particular, a nível do platô, fase esta, como já foi mencionada anteriormente, ser de senescência celular, ou seja, de fase terminal geneticamente controlada, conduzindo à morte celular (Romani, 1987)

2.5 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio.

Na literatura da cultura de tecidos em meio líquido, bastante atenção tem se dado ao nitrogênio em termos de qualidade (fontes) e quantidade (Gamborg & Shyluk, 1970); Schmitz & Lörz, 1990b), pela sua marcada influência no crescimento e manutenção de biomassa celular (Veliky & Rose, 1973). Considerando o carbono um caso a parte, o nitrogênio é o elemento que entra em maior quantidade na composição da maioria, senão de todos, os meios nutritivos em cultura de tecidos de plantas (Butenko, 1968b; Gamborg & Wetter, 1975; Dodds & Roberts, 1983b), sendo que, poderá estar presente como nitrato e/ou amônia. Entretanto, os requerimentos destas fontes pelas diferentes espécies, sob cultura em meio líquido, não são uniformes. Assim, algumas espécies como soja (*Glicine max*) não cresceram bem quando o amônia foi a fonte de nitrogênio, a menos que, ácidos orgânicos houvessem sido incluídos no meio (Gamborg & Shyluk, 1970). Outras, como *Chenopodium rubrum*, exigiram altas concentrações de ambas fontes (Beck & Renner, 1989) e em *Ipomoea spp*, a substituição do nitrato + amônia pela glutamina (10,0 mM) teve um efeito similar sobre o crescimento.

Considerando-se que em culturas de células de alho em meio líquido, não existem referências sobre este particular, o meio líquido BC que vinha sendo usado, foi desdobrado nos seus componentes nitrogenados, como um intento preliminar de conhecer as respostas de crescimento frente às diferentes fontes de nitrogênio contidas nele.

De acordo com o apresentado em resultados (item II.4.5), os efeitos das fontes, atuando separadamente foram menores em termos de diâmetro de sedimento, que nos casos em que estas atuaram combinadas. Isto sugere que as células de alho foram altamente consumidoras de nitrogênio e isto concorda com as observação de campo e de laboratório. Com base em dados e cálculos de análise foliar, foi verificado que para uma população de 333.000 plantas/ha, o consumo de nitrogênio (nitrato) por hectare, foi de 122 kg, sendo superior ao de outros macronutrientes como: fósforo, potássio, cálcio e magnésio (Magalhães, 1986).

Com relação à glutamina, Fig. 17 e Apêndice V, Quadros 5 e 6 pode-se dizer, que sua má performance pode explicar-se em função da baixa concentração utilizada (1 mM), devido a que, quando usada em concentrações maiores (5,0 mM, 3,0 mM) produziu um claro efeito estimulante sobre o crescimento da população celular (Kirby, 1982; Bister-Miel et al., 1985).

De outro lado, se comparadas as molaridades dos tratamentos correspondentes a KNO_3 (NO_3^- : 18,7 mM) e NH_4NO_3 (NO_3^- : 20,6 mM, NH_4^+ : 18,4 mM), poderá observar-se que a molaridade do segundo foi maior que a do primeiro, porém, seus efeitos em termos de crescimento da suspensão celular, foi o mesmo ou seja, não houve diferenças significativas (Apêndice VI, Quadro 5) entre eles.

Isto sugere que para promover o crescimento da população celular não apenas razões de tipo quantitativo devem ser consideradas, senão que também, as de tipo qualitativo, por isso, quando estas fontes foram combinadas num tratamento único ($\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$) a resposta foi superior, Fig. 17, e apêndice VI, Quadros 5 e 6. Entretanto, não deve subestimar-se ainda, o aspecto quantitativo já que a molaridade neste caso (NO_3^- : 39,3 mM, NH_4^+ : 18,4 mM) foi superior a cada uma das fontes do caso anteriormente discutido. Contudo, o aspecto qualitativo, parece mais ponderante no controle, porque a molaridade embora mais baixa (NO_3^- : 25,5 mM; NH_4^+ : 6,1 mM) que a da combinação $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$, a inclusão da glutamina (1mM) favoreceu significativamente, a resposta das células, tornando seu crescimento superior ao tratamento $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$, Fig. 20, Apêndice VI, Quadros 5 e 6. Por outro lado, o efeito estimulante sobre o crescimento, não deve atribuir-se apenas ao fato de ter incluído a glutamina, senão que também ao fato de ter reduzido num terço (de 39 mM para 13 mM a concentração de NH_4NO_3 , isto porque, existem indicações de que níveis fisiologicamente altos de NH_4^+ podem ocasionar fitotoxicidade nas células (Schmitz & Lörz, 1990b). Todavia, os resultados deste experimento, também mostraram que as células de alho foram mais exigentes em NO_3^- que em NH_4^+ , porém, mais experimentação é necessária

para dirimir este problema, já que, ele apresenta visos de alta complexidade. Assim, Beck & Renner, (1989), verificaram um efeito estimulante do NH_4^+ sobre a nitrato redutase, mas este foi um efeito indireto, porque surgiu de uma maior incorporação de NO_3^- por parte da célula e de uma maior mobilização deste íon desde o vacuolo, sob a influência do NH_4^+ , o qual, sugere um efeito importante do NH_4^+ sobre o plasmalena e tonoplasto no "pool" do nitrato, talvez isto, explique o efeito estimulante do NH_4^+ na embiogênese somática, a qual, não tem sido conseguida apenas com NO_3^- (Narayanaswamy, 1977).

Com relação ao pH, Fig. 19 e 22, contata-se a mesma tendência já observada em experimentos anteriores, isto é, de queda brusca na primeira semana e de subida, em geral gradual, depois ao longo do tempo.

Como a variação do pH começou com uma queda brusca na primeira semana, Fig. 19 e 21, pode levantar-se a hipótese de que no presente protocolo, as células em meio líquido, experimentaram uma forte absorção de íons do meio como uma preparação para a segunda fase (fase exponencial) a transcorrer na segunda e terceira semana, por ser esta primeira semana, uma fase de adaptação ou acomodação e de pouca atividade mitótica, as curvas de crescimento neste período apresentaram pouca inclinação quando comparadas com as correspondentes inclinações à segunda e terceira semanas (Fig. 17 e 20).

O período de preparação, não apenas representa incorporação de metabólitos para a célula senão que também uma maior síntese de outros, tais como ATP e NADPH consequência de uma maior ativação das vias glicolítica e pentose fosfato (Shimizu et al., 1977).

Do ponto de vista do metabolismo do nitrogênio, esta maior ativação é plenamente consequente, em função de que a assimilação deste elemento requer de ambos poderes redutores por parte das células, nos diferentes passos enzimáticos, até a formação de ácido glutâmico desde a glutamina (Bidwell, 1979a) mas, como as células estavam no escuro, conclue-se que a redução do NO_2^- para NH_4^+ deve ter acontecido num

plastídio e não no cloroplasto ou seja, sem a participação da ferredoxina, porém, com a participação do NADPH (Salisbury & Ross 1985b).

Com respeito à queda e elevação do pH, no caso de Chonan, tinha-se anteriormente mencionada (item III.2.2) como uma das hipóteses deste fenômeno, à absorção primeira do NH_4^+ e do NO_3^- depois. Na verdade, isto tem sido verificado também na literatura. Schmitz & Lörz, (1990b), relataram que nas primeiras horas da suspensão celular de *Oryza sativa*, o pH da suspensão abaixou, após da absorção do NH_4^+ , de 5,9 para 4,0 e que depois, com a absorção do nitrato este subiu para 8,6, observando-se paralelamente também, uma diminuição na hidrólise de sacarose neste pH.

Com respeito às curvas sobre pH, nas diversas fontes de nitrogênio, esta hipótese ajusta-se bem a todos os casos em que foi incorporado o NH_4NO_3 e $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ no meio. Mas, como explicar a variação do pH no caso em que foi usado apenas KNO_3 ou glutamina?

No tocante a KNO_3 , pode assumir-se que em termos de carga tanto K^+ como NH_4^+ , são similares, isto é, monovalentes, e segundo o verificado por alguns autores, as células em suspensão, apresentam um alto consumo por determinados cátions (Balagué et al., 1982; Singha et al., 1987), sendo assim, e por uma questão de balanço de cargas as células excretariam, em contrapartida, protons ou algum outro tipo de cations, acidificando o meio. Em outras palavras, a acidificação do meio no presente protocolo, não poderia explicar-se apenas em função da absorção de NH_4^+ mesmo que, como fonte de nitrogênio seja primeiro absorvido que o NO_3^- (Zink, 1989). Embora este último pareça ser o geral, existem casos como aquele de *Atropa belladonna*, na qual, a taxa de remoção do NH_4^+ não foi preferencial com respeito ao NO_3^- , quando presente na mesma concentração (Salonen & Simola, 1989).

Com relação à curva de pH da glutamina, Fig. 19, a presença do grupo NH_3^+ , pode explicar a descida da mesma pela absorção desta amida conjuntamente com os cátions do resto do pool de íons presente no meio

líquido, tal como foi argumentado para os outros casos, entretanto, a elevação da curva resulta difícil explicar pelo fato de não ter NO_3^- no meio, talvez o acontecido foi a absorção de outro ânion com a conseguinte exclusão de OH^- comandando esta elevação.

Com relação às variações de pH dentro do contexto aqui apresentadas, cabe reconhecer a dificuldade e complexidade do problema, talvez seja provável que nenhuma das 3 hipóteses levantadas: pool de cátions sendo absorvidos primeiramente, relação NH_4^+ vs NO_3^- e acidificação do meio por acumulação de CO_2 , por si só, expliquem de forma global o problema, e sim, por uma combinação ou participação dos três, segundo as condições experimentais sob os quais se esteve trabalhando: espécie usada, número de células, concentração e fonte de nutriente, etc., isto porque, a concentração de prótons no meio influencia a absorção da maioria dos nutrientes, mas, este pH no decorrer do tempo é afetado reciprocamente pelo efluxo de íons provenientes das células (Schmitz & Lörz, 1990b). Entretanto, fica a dúvida até que ponto a absorção de íons é comandada pelos requerimentos nutricionais das células, ou, pelo gradiente de pH através da membrana, decorrente da ação das ATPases, via co-transporte ou contra-transporte, utilizando a energia da hidrólise do ATP (Salisbury & Ross, 1985a).

No tocante às TCR, Fig. 18 e 21, o maior valor das mesmas foi observado, à segunda semana nos tratamentos $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ e controle, confirmando uma tendência que vinha manifestando-se persistentemente. Por outro lado, este maior valor à segunda semana, concorda com o fato que nestes tratamentos, foi onde foram observadas os maiores diâmetros de sedimento celular, ao cabo da quinta semana, corroborando a hipótese que a primeira semana, foi uma semana de preparo, para já no final desta e começo da segunda, iniciar o "take off" das mitoses e elevação das curvas, quando as condições nutricionais forem favoráveis. Como as condições nutricionais dos outros tratamentos, não foram favoráveis, a "decolagem" ou elevação das curvas correspondentes, Fig. 17, quase não foi diferente da inclinação da primeira semana, o qual, concorda com as TCR da glutamina e NH_4NO_3 que aparecem, estacionárias entre a primeira e

segunda semana, enquanto que a correspondente ao KNO_3 desce ininterruptamente. Mas, a TCR deste último tratamento, chamou a atenção por ela apresentar à segunda semana um valor baixo, apesar de ter experimentado uma forte recuperação de pH na direção do valor inicial (5.8). Provavelmente, por uma intensa absorção de NO_3^- , mas não necessariamente por isso, este tratamento apresentou uma TCR mais alta a partir da segunda semana, o que sugere um papel importante do NH_4^+ , como fator limitante do crescimento das células de Chonan, neste tratamento, mesmo que, a faixa de pH fosse ótima.

III.3 Dos diferentes plaqueamentos

Neste item, existiram duas considerações importantes. A primeira, foi que as células a serem utilizadas deviam pertencer a uma cultura primária em fase exponencial de crescimento. A segunda, foi quando e como aplicar as células ao meio com agar.

Com relação à primeira questão, é importante precisar o conceito de cultura primária no contexto do trabalho. Por **cultura primária**, deve entender-se as células que não foram repicadas ou transferidas desde o inóculo inicial de 10 ml de suspensão celular, (Primrose, 1987).

Um conceito oposto a este é o de **linhagem celular estabelecida**, o qual, expressa a idéia de células que tem sido transferidas ou repicadas periodicamente um alto número de vezes.

Este conceito, a diferença do anterior, não está bem definido no campo da cultura de células animais e humanas, e ambos conceitos, no âmbito da cultura de células vegetais também não. Na área da cultura de células humanas, este último conceito, apenas tem sido delimitado para fibroblastos, os quais, são considerados como linhagem celular estabelecida após a septuagésima repicagem (Fedoroff, 1967).

Quanto à denominação das células repicadas, entre a cultura primária e linhagem estabelecida, alguns autores, da área de cultura de células humanas, tem denominado de cultura secundária ou de linhagem celular (Freshney, 1987; Primrose, 1987).

No presente protocolo, culturas secundárias ou linhagens estabelecidas não foram obtidas, mesmo porque, não entraram nos objetivos iniciais do trabalho, deste modo, apenas foram usadas culturas primárias.

No tocante às células em fase exponencial de Chonan, as usadas foram aquelas de cultura primárias com duas e três semanas de idade, tendo como referência um diâmetro de sedimento celular de aproximadamente 20 mm.

Quanto a como aplicar ou transferir as células, estas foram aplicadas ou transferidas com seringa de mola em lugar de pipeta, em virtude de que as vezes, a saída da pipeta ficava bloqueada e custava desentupi-las, enquanto, o sopro sempre representara um risco de contaminação.

Com respeito ao experimento I.4.1 a combinação ANA/BAP em todos os tratamentos usados forneceu igualmente alto número de micro-calos, tanto superficiais com imersos, mas sendo os primeiros, mais proeminentes e em menor quantidade que os segundos, Fig.s 4A, 4B e 4C, inclusive no tratamento sem fitormônio (controle), o qual sugere, que a condição fisiológica das células usadas como inóculo foi de um estado altamente competente, isto é, de uma condição mitogênica favorável, apesar da mudança de ambiente (líquido para sólido). Este comportamento, por outro lado, sugere que tanto o momento da fase exponencial escolhido para a retirada das células e volume de suspensão utilizado, bem como, a composição do meio MSP foram adequadas. A importância do estado fisiológico das células (explante) em trabalhos desta natureza, tem sido frisada por vários autores (Shahin & Yashar,

1985; Vasil, 1985) e os resultados do presente experimento concordam com isso.

A aplicação de suspensão celular por seringa regularmente correspondeu a 1/5 da quantidade original de aplicação (10 ml: aproximadamente, 36 mg de peso seco) para o estabelecimento de suspensão celular, sendo que, as células encontradas na fase exponencial, Fig. 29, foram constituídas de: células livres, pequenos agregados (2-10), medianos agregados (10-20) e agregados maiores difíceis de contar, porém, células alongadas e vacuoladas como as registradas em outras referências (Arnison & Boll, 1976; Yeoman & Street, 1977) foram apenas raramente encontradas, que dizer, o caráter meristemático foi evidente, mas de qualquer maneira, a quantidade de inóculo presente nos 2 ml, devia estar dentro ou acima da faixa de 10^3 a 10^4 células/ml consideradas por alguns como crítica para o sucesso do plaqueamento (Horsch, 1984), mas que para outros este número foi maior: 5×10^4 , como no caso de células tratadas com mutagênicos antes de plaquear (Weber & Lark, 1979).

Na literatura o problema dos agregados presentes na suspensão celular, não tem sido contornada e os métodos físicos e químicos que tem dado certo para algumas culturas, não tem dado certo para outras e, uma das consequências mais diretas desta problemática tem sido a dificuldade de usar métodos eletrônicos para a quantificar mais rápido o número de células (Kubek & Shuler, 1978b), inclusive, no presente protocolo, este problema tentou-se resolver através do uso do ácido crômico (Butenko, 1968c) e contagem com câmara de Neubauer, mas, não foi possível com a metodologia empregada, alcançar um bom nível de desagregação (dados não apresentados).

Com relação ao meio MSP, as únicas inovações em relação ao meio básico BC foi o açúcar, que em lugar de 20 g/l foi usado 30 g/l, caseína e Difco-ágar, de resto, nada foi modificado exceto os fitormônios que entraram nos tratamentos (ANA/BAP), sugerindo isto, entre outras coisas, que as células de Chonan no plaqueamento não foram

exigentes em substratos ou nutrientes especiais e que, o tipo de ágar utilizado, não foi tóxico ou inibitório para as células, o qual, foi uma vantagem, já que, um suporte sólido mais puro como gelrite, além de ser mais caro, é difícil de encontrar no mercado nacional.

Apesar de que todos os tratamentos com fitormônio, não apresentaram diferenças quantitativas visíveis foi escolhida a combinação ANA/BAP de 1,0 mg/l e 0,5 mg/l respectivamente, como fitormônios, permanentes do meio MSP, combinação esta algo diferente da dosagem de 0,5 mg/l de 2,4-D e 0,5 mg/l BAP (Ferreira, 1985) ou, muito diferente desta outra: 5,0 mg/l AIA, 0,5 mg/l 2,4-D e 0,3 mg/l 2iP (Polacco, 1979).

Com relação ao papel filtro intermediando entre o meio sólido e as células, a inclusão deste artifício demonstrou ser uma boa prática para o crescimento das células de *Chonan*, ao mesmo tempo que, representa um bom expediente para: remoção rápida e fácil das células, monitoramento prático das mesmas (peso seco e peso fresco), troca de meios, envolvendo diferentes tratamentos, sem maior dano para as células e por último, uso no sistema de "feeder layer", na cultura de protoplastos (Horsch & King, 1980; Prioli & Söndahl, 1989).

O procedimento de misturar um volume definido de suspensão celular ou de protoplastos com outro volume de meio morno + ágar, tem sido um procedimento frequente nos trabalhos de plaqueamento, visando indução do calo primeiramente e regeneração depois (Street, 1977; Evans & Bravo, 1983).

Ainda relacionado com suspensão celular de alho, dados sobre esta maneira de plaqueamento, não são disponíveis na literatura, bem como, outros aspectos decorrentes deste procedimento, por exemplo, viabilidade celular, efeito do tamanho de placa, quantidade de ágar etc.

Com relação ao experimento 1.4.2, foi verificado, item II.7.2, que houve uma correlação negativa entre o número de diluições da

suspensão celular e o número de calos induzidos, porém, a correlação foi positiva quando analisados os dados em função do volume de suspensão celular aplicados (5, 10 e 20 ml) e o número de calos por cm^2 obtidos. Dentro de qualquer um dos dois enfoques, a diminuição de microcalos foi compreensível porque, houve uma diluição do número de células. Deste ponto de vista, no caso de 20, 10 e 5 ml, a quantidade de suspensão celular por cada uma das quatro placas dos tratamentos seria aproximadamente de 5,0, 2,5 e 1,25 ml, representando isto, uma diluição progressiva da densidade celular. Como já foi mencionado anteriormente, há uma dificuldade na indução da proliferação celular quando o número de células plaqueadas não enquadra-se dentro ou acima, da faixa crítica. Este problema, segundo alguns, entre eles Kao & Mickayluk, (1975), pode ser contornado usando meios altamente suplementados. Por esta via, estes autores chegaram a cultivar até 5 células/ml.

Com respeito à distribuição dos calos nas placas, estes ficaram bem distribuídos, inclusive, facilitando a contagem, porém, a maioria no fundo ou na espessura do agar, fenômeno este, um tanto inverso ao plaqueamento com seringa, item I.4.1 além do mais por este último procedimento, a indução de calos foi maior quando comparado com o tratamento que deu melhor resultado (aplicação de 20 ml). Talvez, isto reflita algum grau de diferenças no estado fisiológico das células ou, outro tipo de fator. Um desses fatores poderia ser a viabilidade das células, restringidas por exemplo, por uma oxigenação insuficiente, mas, o teste de viabilidade com o azul de tripano, item II.7.3, Quadro 9, elimina esta hipótese porque deu reação positiva em todos os tratamentos, sugerindo que a diminuição decrescente do número de calos foi mais por causa da densidade inicial do número de células, que por mediação de outro fator, tal como o do arejamento ou nutricional. Entretanto, deve considerar-se que na menor densidade do número de células, 5 e 10 ml, devia também ter influído o choque térmico, assim provavelmente, muitas das células foram afetadas negativamente, diminuindo mais ainda o potencial proliferativo, mas que, as que ficaram incólumes ou relativamente incólumes, originaram microcalos viáveis porém de pequeno tamanho. O problema de temperatura do ágar é um risco

permanente ao qual sempre se deve estar alerta (Dodds & Robert, 1983d). Em relação ao tamanho destes calos, resulta curioso que os superficiais tenham-se desenvolvido mais que os imersos. Talvez possa levantar-se a hipótese de que o tamanho dos microcalos, mas não a indução, foi mais afetado por uma baixa disponibilidade e/ou difusibilidade do oxigênio, sendo assim, as células do centro dos agregados maiores ficaram numa situação de "enviromental" diferente das da periferia, por isso então, um menor tamanho de colônias já que menor oxigenação (< 21%) implica uma menor produção de ATP e conseqüentemente, uma menor velocidade de transporte ativo, de muitos íons a nível de plasmalema (Salisbury & Ross, 1985a), repercutindo finalmente, tudo isto, numa menor taxa de proliferação celular.

Considerando que o tamanho da placa pudera ser um fator envolvido diretamente ou indiretamente nesta questão do crescimento aquela variável foi pesquisada, item I.4.2.1.

De acordo com o item II.8.4. de fato, houve uma alta proliferação em ambos tipos de placa, Quadro 10, porém, os calos imersos das placas maiores em média cresceram mais, possivelmente em decorrência de uma maior disponibilidade de nutrientes e oxigênio. Entretanto os imersos continuaram a crescerem menos que os superficiais.

Como a distribuição do meio MSP nas placas foi feita de forma alternada e todas as células provinham de um mesmo frasco erlenmeyer, despreende-se que aqueles fatores foram mais críticos nas colônias imersas das placas pequenas. Contudo, ainda não aparece clara a diferença de tamanho entre calos imersos e superficiais.

Tentando encontrar uma resposta a esta questão, foi que se preparou o experimento I.4.4, cujos resultados aparecem no item II.7.5, Quadro 11. Em termos de número de calos e crescimento nos diferentes tratamentos, os resultados foram muito poucos, demonstrando que hipótese do arejamento não satisfiz as expectativas imaginadas, ficando portanto por conta de outros fatores, a ação limitante sobre o crescimento dos

calos superficiais. Um desses fatores, poderia ser a baixa quantidade de células no volume de suspensão celular inoculado na superfície das placas (1 ml), mesmo assim, as colônias que se desenvolveram (1 mm a 2 mm de diâmetro) era de se esperar que houvessem desenvolvido mais, se o fator limitante houvesse sido a taxa de oxigênio, mas não foi isso o que aconteceu, portanto descarta-se este fator.

É possível que em função do tempo, os nutrientes mais superficiais das placas, tenham descido por efeito gravitacional, ficando portanto, fora do raio de ação das células superficiais entretanto, se isto houvesse sido verdadeiro, nos tratamentos de maior concentração de agar (8 g/l e 10 g/l), caberia esperar um maior crescimento, em função da maior compactação do agar, e portanto, de maior retenção dos nutrientes superficiais. Mas, tampouco foi isto o que aconteceu, já que, no tratamento de 6 g/l de agar (menor compactação) o crescimento dos calos e o número deles foi muito parecido ao dos outros dois tratamentos, apesar de que pela linha de razoamento estabelecida deveria ter sido muito menor, já que os nutrientes deveriam ter difundido mais para o fundo da placa.

Foi claro então, que este procedimento não produziu o grau de otimização esperada, e concorda com o verificado por Ferreira, (1985), quando usando um procedimento muito parecido com este, não constatou superioridade dos resultados em relação aos outros tratamentos utilizados. Portanto, a questão de maior crescimento dos calos superficiais com respeito aos calos imersos fica aberta, entretanto, como os primeiros pela via da mistura de volume (x ml de meio + y ml suspensão), no plaqueamento, sempre proporcionou maior quantidade de calos imersos, foi considerado conveniente explorar um pouco mais esta questão.

BAP, KIN e 2iP, são três citocininas que tem sido usadas separadas ou combinadas com ou sem auxina na cultura de tecidos vegetais, visando formação de calos, organogênese ou embriogênese (Flick et al., 1983; Finer & Nagasawa, 1988), por isso, foi considerado

importante que em relação ao plaqueamento de Chonan elas fossem testadas procurando estabelecer qual poderia melhorar mais ainda, o presente protocolo. Para isso, vários experimentos foram preparados. No primeiro, item I.4.5, os resultados mostraram, item II.7.6, que praticamente não houve diferenças marcantes nas três citocininas, quanto ao número de microcalos e tamanho dos mesmos, Fig.s 31A, 31B e 31C, o que indica que, através deste procedimento, nenhuma citocinina foi superior à outra. Contudo, as diferenças nas médias por repetição, podem ser atribuídas à distribuição aleatória das colônias, após verter o meio nas placas, sendo que, para evitar riscos de contaminação estas não foram agitadas ou mexidas. Todavia, observa-se na Fig. 31A, 31B e 31C, um bom padrão de distribuição das colônias, as quais, como já especificado, item II.7.6, foram em sua maioria imersas.

Como foram usados 100 ml de "mistura" (80 ml meio + 20 ml de suspensão) a diluição das células foi de um fator 5, correspondendo em teoria a 4 ml de suspensão para cada uma das 4 placas. Pelos resultados apresentados, segue-se que esta proporção 4:1 na modalidade de "mistura" foi adequado. Mas, uma proporção maior, por exemplo, 3:1 (60 ml + 20 ml) teria sido melhor, porque se a diluição houvesse sido de 1/3 apenas e não de 1/5, como no caso anterior, igualmente teria fornecido 4 placas com 20 ml cada uma, mas, uma menor diluição, apresenta o problema de maior densidade de colônias por área, o qual, poderia constituir-se em um obstáculo na eventualidade de seleção de mutantes ou variantes, porém, se o objetivo é formação de calos visando regeneração pura e simplesmente, uma menor diluição, provavelmente, seria mais conveniente.

Na sequência de experimentos, um experimento paralelo ao anterior, item I.4.6, na qual as citocininas foram ultrafiltradas e não autoclavadas, os resultados mostraram, item II.7.7, que BAP e 2iP tiveram um melhor desempenho que KIN, inclusive pode observar-se, Quadro 13, que BAP apresentou um efeito levemente superior a 2iP, mas, com um desvio padrão maior. Foi curioso observar, Quadro 13, com relação ao tratamento com KIN do experimento anterior, item II.7.6, Quadro 12, que o número de calos caiu, enquanto que o das outras citocininas aumentou,

Fig. 31D, 31E e 31F, sugerindo, no geral, um maior efeito deste último experimento, (filtração) em relação aquele de citocininas autoclavadas mas, quando a ultrafiltração foi combinada com a aplicação das citocininas via seringa, item I.4.7, os resultados, item II.7.8, foram muito superiores aos dois experimentos anteriores, ao ponto de ser difícil fazer contagens pela alta profiferação de calos superficiais nos tratamentos de BAP e KIN, Fig. 32A, 32B e 32C, curiosamente KIN em relação ao experimento anterior, teve comparativamente melhor performance, e 2iP que teve uma segunda posição anteriormente, agora passou a ocupar um terceiro lugar. Apenas BAP através de todos os experimentos de plaqueamento mostrou uma posição de destaque e, em função dessa regularidade se recomendará seu uso em combinação com ANA nas concentrações utilizadas para fins de plaqueamento, seja pela via de aplicação por seringa ou mistura de volumes. De um lado, BAP por ser uma citocinina sintética, é de custos menos onerosos que 2iP ou zeatina.

Embora os resultados mais expressivos em termos de número e crescimento de microcalos, tenham sido conseguidos através da via de aplicação por seringa, itens II.7.1 e II.7.8, foi considerado interessante comparar simultaneamente estes dois tratamentos, item I.4.8.

Como foi de prever, o procedimento de seringa teve um maior efeito em termos de número e crescimento de calos superficiais, porém, um menor número de microcalos imersos. Fig. 32D e 32E.

O maior desenvolvimento dos calos obtidos pela via da aplicação por seringa, apesar do menor número de células iniciais, foi provavelmente devido ao fato que as células não ficaram estritamente na superfície do meio, senão que, algo incrustadas e empilhadas neste, isto porque a suspensão celular foi impelida com certa força desde a seringa, inclusive, chegando até fazer algumas fendas no agar, o que possivelmente, facilitou a nutrição e a oxigenação, já que as células não ficaram nem totalmente superficiais nem totalmente afundadas ou imersas, e, pelo que já se discutiu anteriormente, estas duas posições

atribuiu-se exercer uma restrição no crescimento dos microcalos.

O comum denominador que foi observado entre os microcalos que ficaram na superfície, item II.7.5 e os que ficaram imersos no agar item II.7.6, foi seu espalhamento, o que indicou que as células ficaram muito separadas nas placas, entretanto, no procedimento por seringa se favoreceu mais o agrupamento celular, Fig. 30 e 32, sendo que tal parece estes agrupamentos foram a chave para o crescimento dos microcalos, itens II.7.1, mas a rigor, ignora-se até que ponto, este novo ponto de vista é verdadeiro e possa explicar realmente as diferenças entre plaqueamento via seringa e via mistura de volume. É difícil decidir apenas com os dados experimentais aqui reunidos. Entretanto, cabe ressaltar que é possível imaginar uma certa analogia entre estes agrupamentos e aqueles do "feeder layer" (Evans & Bravo, 1983; Horsch 1984; Rhodes et al., 1988) em função dos metabolitos que possam transferir-se mutuamente.

III.4 Da regeneração

A habilidade de regenerar plantas através de uma metodologia sob controle experimental, é um objetivo permanente da cultura de tecidos, nas suas diferentes modalidades: suspensão celular, protoplastos, cultura de órgãos, etc.

Na cultura de tecidos das diferentes espécies (anuais e perenes), a regeneração tem sido alcançada não apenas com diferentes citocininas e auxinas, senão que também, com diferentes balanços das mesmas, mas, tendo como base na grande maioria dos casos, o meio MS ou B5, porém, com requerimentos variados de luz e temperatura que tornam mais difíceis ainda, as generalizações sobre este assunto (Evans & Bravo, 1983).

Dentro do contexto do alho, multiplicidade de cultivares dentro de uma mesma espécie, o problema da regeneração em termos

hormonais não tem sido uma exceção. Assim, Kehr & Schaeffer, (1976), induziram regeneração com um balanço hormonal KIN/AIA de 1,0 mg/l respectivamente e, Abo EL-Nil, (1977) com 2,15 mg/l de KIN e 1,75 mg/l de AIA, mas, Novak et al., (1986), informaram de um balanço ainda maior: 10,0 mg/l de KIN e 2,0 mg/l AIA. Entretanto, Illg & Siqueira, (1986), recomendaram 5,6 mg/l BAP e nada de auxina, enquanto que Nagasawa & Finer, (1988), usaram 2,0 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de ANA.

Frente a esta diversidade, foi julgado, experimentar um caminho próprio, com base nos resultados já obtidos, 2,4-D nas curvas de crescimento e nos de regeneração com adenina, item I.3.3.

A resposta do experimento 1, item I.5.2, foi sintomática, item II.8.1, porque sinais de regeneração foram conseguidas apenas nos tratamentos em que o 2,4-D esteve ausente, o qual, concorda com o verificado por outros autores no sentido que esta auxina foi inibitória para a regeneração do alho (Kehr & Schaeffer, 1976; Novak et al., 1986), embora, ele tenha-se mostrado como uma boa promotora de calos (Nagasawa & Finer, 1988) e de estabelecimento de culturas primárias como demonstrado no presente protocolo.

Com base nos resultados de regeneração, item II.2.1, Quadro 4, de calos envelhecidos, foi montado o experimento I.5.2 e depois o I.5.3, visando melhorar a regeneração dos calos que passaram pelas diferentes concentrações de adenina, Fig. 33A. De fato, esta melhorou muito em relação às plantas que não passaram pela adenina. Deste modo, se abriu um precedente na literatura da cultura de tecido do alho, sobre o uso da adenina na indução da regeneração e não apenas na indução de calos, como verificado por outros autores e para outras espécies (Reynolds & Murashige, 1979; Bennici et al., 1988).

Tentando melhorar o crescimento das brotações, com um segundo passo, foram comparados dois meios: com e sem maizena, MSRM e MSR-1 respectivamente, item II.8.3. Em ambos tipos de meio, Fig. 33B e 33C, foi conseguido um resultado semelhante embora, MSRM tenha sido um pouco

superior nos casos com alta brotação (+++), Quadro 14. Na literatura, não foi possível encontrar referências sobre este particular, mas, foi incluído como variável neste experimento, não apenas por ser uma fonte potencial de algum nutriente importante para as brotações, senão que também, pelo fato de dar suporte sólido aos meios, evitando o uso de agar, ingredientes este, mais caro que a maizena.

Nas gramíneas, sabe-se que a α -amilase produzida pela aleurona, desdobra o amido do endosperma (Jacobsen & Chandler, 1987). Mas, no presente caso, carece-se de evidências para suspeitar numa possível atuação desta enzima a partir dos brotos de Chonan, por isso, conjectura-se que o papel principal da maizena seja de suporte e secundariamente, de fornecedora de algum nutriente mineral ou molécula orgânica especial, em decorrência deste tipo de amido não ser de alta pureza.

Dando continuidade à linha de otimização da regeneração, o experimento, na qual se comparou o meio MSR-1 com duas concentrações de sacarose 6% e 3%, item II.8.4, Quadro 15, revelou um efeito pouco superior do meio MSR-1 6% de sacarose, sobre o crescimento das brotações, entretanto, deve frisar-se que o método aplicado de contagem não revelou cabalmente a realidade, pois não entraram na contagem as inúmeras brotações curtas menores que 5 cm, que no caso de MSR-1 6%, foram muito abundantes, mas pelo condensamento, Fig. 33D e 33E, foi difícil contar individualmente.

Em estudos sobre topófise, foi verificado também, que altas concentrações de sacarose, estimularam o crescimento das brotações (Evers, 1987). Altas concentrações de sacarose também tem sido utilizadas em: criopreservação (Kobayashi et al., 1990), enraizamento (Drivers & Suttle, 1987) e armazenamento de meristemas a 4°C (El-Gizawy & Ford-Lloyd, 1987).

No experimento com AgNO_3 , item I.5.6, os resultados sugeriram, item II.8.5, um certo envolvimento do etileno, já que foi possível

aumentar as brotações com respeito ao controle, revelando assim outra faceta de complexidade do problema da regeneração.

O etileno tem sido apontado como um hormônio importante para a planta, participando de vários processos, entre eles: cicatrização, senescência, mudanças de pigmentação de frutas, etc (Lieberman, 1979). Entretanto este gás, do ponto de vista da cultura de tecidos, tem sido responsabilizado por alterações morfogênicas que interferem com a regeneração, (Chi & Pua, 1989), em consequência de sua produção pelo tecido calogênico (Sodi et al., 1989) e pela sua acumulação dentro dos frascos selados (Hussey & Stacey, 1981).

Esta interferência do etileno, poderia ser minimizada entre outras substâncias por: o perclorato de mercúrio (Huxter et al., 1979), poliaminas (Galston, 1983) e AgNO_3 (Roustan et al., 1990), sendo que, a primeira atua absorvendo o gás desde o ar do frasco impedindo sua acumulação; a segunda, bloqueando sua síntese e a terceira, competindo com seus receptores a nível de plasmalema (Lieberman, 1979).

Com relação aos calos Chonan, a ação bloqueadora do AgNO_3 sobre o etileno, foi patente nas concentrações de 2,5 mg/l e 5,0 mg/l, Quadro 16, onde permitiu um efeito estimulante da adenina sobre a indução da regeneração, porém, no controle, onde apenas esteve presente a adenina o desbloqueio não se deu e por isso, provavelmente, a regeneração não se concretizou. Por outro lado, o fato que nas concentrações de 1,25 mg/l e 10,0 mg/l de AgNO_3 , tenha havido uma baixa resposta, ajusta-se, do ponto de vista fisiológico, ao comportamento de uma curva de dose-resposta, onde pode esperar-se que baixas ou altas concentrações apresentam pouco ou nada de capacidade efectora. Contudo, torna-se necessário frisar que além do baixo número de brotação, estas foram curtas. Talvez isto, tenha acontecido em função do tipo de calo usado no experimento, pois, foram usados calos envelhecidos e não provenientes do plaqueamento, onde, segundo foi demonstrado, Quadro 14 e 15, estes apresentaram um alto potencial de regeneração, de outro lado, isto sugere que neste último tipo de calo, o etileno não tenha sido um

problema, possivelmente em função da juvenilidade do material, finalmente vale a pena esclarecer, que a prata é um metal pesado e que seu impacto no comportamento geral do tecido como por exemplo, o grau de comprometimento de efeitos colaterais, não foi avaliado, contudo, como já foi mencionado, item II.8.5, sintomas de toxicidade, nos calos não foram observados.

III.5 Da bulbificação

Do ponto de vista da transferência do alho para o campo, o material regenerado "in vitro" é melhor bulbificá-lo que enraizá-lo, devido a que nesta condição pode estocar-se até a próxima época de plantio. De qualquer maneira, a planta enraizada que foi transferida para o solo, teve um desenvolvimento normal, Fig. 35.

Em geral os textos de Fisiologia Vegetal, tem dado um enfoque muito superficial ou então, não abordado a questão (Street & Opik, 1970; Salisbury & Ross, 1985d; Davies, 1987). Por outro lado, na literatura disponível da cultura de tecido do alho, o tema de bulbificação não tem sido abordado porque a preocupação foi mais morfogênética e/ou somaclonal (Novak, 1974; Novak, 1983; Novak et al., 1986; Nagasawa & Finer, 1988).

Por outro lado, e de acordo com Vince-Prue, (1975), existem vários fatores relacionados com a formação de órgãos de reservas, entre eles: o fotoperíodo, qualidade e intensidade da irradiância e, aplicação exógena de sacarose e fitormônio. Em função destas duas últimas considerações, foi que se prepararam os experimentos I.6.1 e I.6.2.

Com referência ao primeiro experimento, efeito de diferentes níveis de sacarose, (Quadro 17), 6% de sacarose demonstrou ser um bom tratamento para a indução de bulbificação, (80%), e como no nível de 3% de sacarose, a bulbificação foi muito baixa, (20%), concluiu-se que a influencia do fator sacarose em alta concentração, foi mais decisivo que

o fator fotoperíodo, no desencadeamento da formação de bulbos, Fig.s 24A e 24B. De fato, nos ensaios preliminares com meio MSC 3% de sacarose e condições de laboratório, a formação de bulbos foi considerada baixa e demorada.

Como o enraizamento foi maior no tratamento da sacarose 6%, segue-se, que isto favoreceu, um maior desenvolvimento da massa foliar, como de fato aconteceu, e portanto também, uma maior mobilização de fotoassimilados, incluindo possivelmente o(s) fator(es) do mecanismo de bulbificação, já que este fenômeno, como o fotoperiodismo e natureza indutiva (Vince-Prue, 1975).

Com relação ao segundo experimento, MSC 6,0% com e sem auxina, uma superioridade do tratamento com AIB foi constatada, Fig.s 34C e 34D, Quadro 18. É possível que este tenha acontecido em função de um efeito paralelo à alta concentração de sacarose, por exemplo, aumentando a força de dreno dos bulbilhos, porém, indiretamente através do etileno, o qual, é conhecido pela reação inibitória do crescimento longitudinal e de estimular o crescimento radial das células (Vince-Prue, 1975), configurando desta forma, um maior enchimento dos bulbilhos, o qual, explicaria o maior número deles acima da média: 58% contra 42% do tratamento sem auxina.

III.6 Avaliação do pH nos meios de calos friáveis

O pH inicial da maioria dos meios nutritivos é fixado entre 5,5 e 5,8, e, fora destes limites é difícil encontrar outros valores (Gamborg & Wetter, 1975). Mas, este pH inicial sofre variações por causa da autoclavagem (tende a diminuir), e depois, pela ação do explante (células ou tecidos). Levando em conta estes antecedentes, foi que se procedeu a medir o pH dos meios dos calos friáveis, usados na obtenção das suspensões celulares, para verificar o grau de afastamento em relação ao pH inicial, após 2 meses, período este correspondente ao período de repicagem dos frascos.

Conforme se pode apreciar nas Fig. 23 e 24, 25 e 26, a distribuição dos calos de ambas cores em relação ao pH tendeu a mostrar uma distribuição característica, sendo que, a variação se concentrou maioritariamente na faixa de pH entre 4,0 e 5,0 e não entre 5,0 e 6,0, assemelhando-se ao padrão de variação de pH das culturas em meio líquido já discutidas anteriormente.

Dos antecedentes expostos fica claro, que em Chonan, a variação do pH do meio foi um fenômeno comum, embora esta variação, nos meios sólidos pode ser contornada com o uso de gelrite em lugar de outros tipos de agars (Williams et al., 1990), e, nos meios líquidos, através de uso de altas concentrações de tampão (0,1 M), porém, sem clara vantagem para os resultados em termos de crescimento dos calos e diferenciação (Banthorpe & Brown, 1990).

Com relação aos calos amarelos e bege, embora não fossem feitas comparações quantitativas com respeito a seu crescimento (exemplo: matéria seca), a observação periódica de ambos grupos, revelou um bom crescimento, pois a partir de um inóculo de 15 mm de diâmetro, aproximadamente, por volta dos 60 dias apresentaram tamanhos que flutuaram entre 25 e 30 mm de diâmetro, quer dizer, apesar de que os calos amarelos apresentaram um maior número de casos com pH perto do inicial, em relação aos bege, Fig. 23 e 25, Fig. 24 e 26, isso não se reverteu, aparentemente, numa maior performance de crescimento. Com aquele aumento de massa, foi de supor que o substrato (meio MSF) devia ter fornecido os elementos nutricionais correspondentes, numa interação célula-meio, cujo balanço final, após os 60 dias terminou com o pH apresentado nas figuras já mencionadas, sendo que, na faixa de pH entre 4,0 e 5,2 a solubilidade tanto de macro como de micronutrientes em geral é compatível ainda com a solubilidade destes elementos (Sutcliffe & Backer, 1974), portanto, disponível para sua absorção. Os resultados da presente avaliação, são concordantes com este ponto de vista.

Com relação às diferenças de coloração, estas refletiram provavelmente, e existência de duas linhas de calos, porque em geral os calos bege, foram muito mais friáveis e menos modulares que os amarelos, ou bem, refletiram simplesmente, um problema de envelhecimento, mas não, de senectude já que, eles forneceram também, boas suspensões celulares, contudo, a eficiência de ambos tipos de calos não foi avaliada.

De acordo com Narayanaswamy, (1977), a pigmentação de um calo pode ser influida por vários fatores entre eles: presença de amido solúvel, deficiência de nitrogênio, temperatura, luz e auxina exógena. No caso presente, já foi mencionado que a presença de 2,4-D tornou estes calos sem clorofila, entretanto, a razão específica pelas quais uns ficaram mais claros que os outros, são ignoradas.

III.7 Contaminação bacteriana

Em alguns casos, a contaminação bacteriana pode ser endógena e por isso mesmo, difícil de erradicar, porque um tratamento com um antibiótico específico, poderá não resolver o problema em consequência da contaminação envolver vários tipos de bactérias, ou porque, a aplicação em altas doses destes quimioterápicos, poderia matar as bactérias, mas, existe o risco de produzir outros efeitos, como ser, a inibição de síntese de clorofila quando incluídos permanentemente no meio (Butenko, 1968a).

Por outro lado, a contaminação também pode ser decorrente de uma esterilização externa deficiente do explante ou, do manuseio periódico da cultura de forma inadequada em alguns dos passos das inúmeras subculturas (Falkiner, 1990).

De acordo com Leifert & Waiter, (1990), a contaminação bacteriana é a mais séria de todas e, segundo os mesmos autores vários gêneros tem sido identificados contaminando as culturas "in vitro", entre eles: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*,

Pseudomonas, Micrococcus, Staphylococcus e Xanthomonas.

No caso do presente protocolo, a contaminação foi frequente, no começo, porém, esporádica depois, por isso, foi concluído que esta contaminação foi decorrente do manuseio periódico dos frascos, e não de origem endógena dos calos, do contrário, a contaminação teria sido permanente e inviabilizado os trabalhos.

Como já mencionado no item II.6 resultados, as bactérias contaminantes foram identificadas como Gram+ pertencendo ao gênero *Bacillus*. Este tipo de bactéria, caracteriza-se por formar esporos (Davis & Dulbecco, 1979), as quais, levadas pelo ar penetram qualquer espaço, inclusive, o da câmara de fluxo laminar e são de tal natureza, que inclusive, podem suportar a temperatura de 120°C até por 20 minutos, tal é o caso de *Bacillus cereus* e *B. circulans* (Leifert & Waiter, 1990), pelo que, cuidados com relação a lavagens dos frascos, esterilização do material e vedação da entrada dos frascos antes e depois de receber o meio, devem ser permanentes. Foi por este caminho, que no presente caso a contaminação foi reduzida, ou seja, extremando as precauções de trabalho.

CONCLUSÕES

1.- A presença de 2,4-D, (1,0 mg/l), foi fundamental no meio MS modificado, MSF, para a transformação de calos clorofiláceos compactos em aclorofiláceos friáveis.

2.- Para o estabelecimento e manutenção de uma cultura primária em meio líquido, foi verificado que o meio MS modificado, BC, suplementado com 2,4-D/BAP, 0,5/0,5 mg/l respectivamente, proporcionou curvas típicas de crescimento, com aproximadamente 5 semanas de duração, onde foi possível identificar uma fase ascendente, exponencial, e uma estacionária.

3.- O monitoramento do crescimento da População celular, através da medida do sedimento celular com régua comum, demonstrou ser um procedimento prático e fácil, para se estudar o efeito de fatores nutricionais, hormonais ou de outra ordem.

4.- Através do meio BC, fatores tais como: rifaldin, sacarose não PA e MES, nas concentrações testadas, não exerceram efeitos inibitórios sobre o crescimento final das respectivas populações celulares.

5.- Com respeito às fontes de nitrogênio testadas, tendo como base o meio BC, foi verificado que a combinação dos seguintes componentes: L-glutamina, (146,00 mg/l), KNO_3 (1900,00 mg/l), NH_4NO_3 (550,00 mg/l), foi superior a cada uma destas fontes isoladas e também, à combinação $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ (1900,00 mg/l + 1650,00 mg/l).

6.- Em relação ao plaqueamento, foi constatado que o meio MS modificado, MSP, na combinação hormonal ANA/BAP, 1,0 mg/l e 0,5 mg/l respectivamente, apresentou um efeito superior e mais regular que a combinação ANA/KIN ou ANA/2iP, sobre a indução de microcalos.

7.- O expediente de colocar uma camada de papel filtro, sobre as placas de Petri contendo meio MSP, foi um bom procedimento para promover a indução de microcalos, a partir de um inóculo celular.

8.- Para a inoculação das células nas placas de Petri, dos procedimentos foram testados: um via seringa, e outro, via "mistura de volume", sendo que, visando regeneração, o primeiro foi considerado melhor, porque forneceu calos superficiais mais numerosos e maiores.

9.- Quanto à regeneração, foi verificado que a adenina no meio MS modificado MSR-1, em doses crescentes de 10,0 mg/l e 20,0 mg/l aos 30 e 60 dias, estimulou a brotação de calos oriundos dos plaqueamentos. De outro lado, o efeito do AgNO_3 sobre a regeneração de calos friáveis, nas concentrações testadas, foi considerado pouco eficaz.

10.- No tocante ao crescimento das brotações, foi constatado que o meio básico MSR-1 contendo maizena (7,0%) ou sacarose não PA 6,0%, foi superior ao meio básico MSR-1, contendo apenas sacarose não PA 3,0%.

11.- Para o crescimento e manutenção de plântulas isoladas (provenientes de brotações em meio básico MSR-1) o meio MS modificado, MSC, permitiu um bom desenvolvimento dos mesmos, mas, sem favorecer a bulbificação.

12.- A bulbificação foi melhor estimulada, quando meio MSC, além de sacarose não PA 6,0%, foi suplementado, transitoriamente, com AIB 3,0% mg/l.

13.- A contaminação bacteriana foi mais difícil de controlar do que a fúngica. Esse controle porém, pôde ser feito sem antibiótico, apenas intensificando os cuidados de manipulação em câmara de fluxo laminar.

RESUMO

O alho (*Allium sativum* L.) é uma hortaliça que se propaga única e exclusivamente pela via vegetativa, portanto, é difícil de estabelecer um programa de melhoramento, no sentido clássico, que implique recombinação gênica a nível meiótico. Por isso, nesta espécie a cultura de tecido tem sido enxergada como uma alternativa viável para induzir e detectar variações e/ou mutações. Dentro da cultura de tecidos, a suspensão celular e a cultura de protoplastos, podem ser bons sistemas para este tipo de trabalho. Entretanto, em alho não existe uma metodologia pronta que envolva regeneração de plantas a partir de células em suspensão ou protoplastos. Por considerar que a suspensão celular como técnica, é mais abrangente e versátil que a cultura de protoplastos, foi objetivo do trabalho estabelecer um protocolo de suspensão celular que incluísse: obtenção de calos friáveis⁽¹⁾, estabelecimento de células em meio líquido⁽²⁾, indução de calos por plaqueamento⁽³⁾, regeneração de plantas⁽⁴⁾ e bulbificação⁽⁵⁾.

(1) - Com relação à obtenção de calos friáveis, estes foram conseguidos a partir de calos Chonan envelhecidos e compactos, usando meio MS modificado, aqui identificado por MSF, e cuja composição foi: **sais: MS. Vitaminas** (1,0 mg/l): pantotenato de Ca; piridoxina. HCl, tiamina HCl e ácido nicotínico. **Orgânicos** (mg/l): inositol 100,00; caseína hidrolisada 250,00 e sacarose não PA 30.000,00, ágar Cialga 7.500,00. **Hormônio:** 2,4-D 1,0 mg/l.

(2) - Para o estabelecimento da suspensão celular, foi usado o meio BC, o qual, foi uma modificação do meio MS e cuja composição foi: **sais: MS**, porém, $\text{NH}_4\text{NO}_3/3$ e Fe-EDTA/2. **Vitaminas:** as mesmas do MSF, porém, 3,0 mg/l. **Orgânicos** (mg/l): inositol 100,00, sacarose PA 20.000,00, L-glutamina 146,00. **Hormônios:** 2,4-D e BAP 0,5 mg/l respectivamente, sendo que, estes mais a L-glutamina e vitaminas foram ultrafiltradas por membrana de acetato de celulose 0,22 um de diâmetro de poro.

A determinação da curva de crescimento da população celular, foi feita medindo-se externamente, com régua comum, o diâmetro do sedimento interno da população. Este procedimento inédito na literatura, proporcionou curvas de crescimento similares às encontradas nas referências consultadas, embora, estas tenham sido realizadas a partir de matéria seca, fresca, ou através de contagem celular.

A combinação de hormônios do meio BC, foi selecionada a partir de várias combinações de 2,4-D/BAP, nas quais foi constatado que: 0,0/0,5, 0,5/0,5 e 1,0/0,5 mg/l, proporcionaram curvas de crescimento muito similares, estimulando o crescimento da população celular sobre os outros tratamentos. Mas, foi selecionada a segunda combinação, como formando parte permanente no meio BC, em razão da menor concentração de ambos fitormônios.

Dos diferentes fatores não hormonais incluídos no meio BC, visando avaliar sua influência no crescimento da população celular, foi verificado que rifaldin, sacarose não PA e MES, nas concentrações testadas, não produziram efeitos inibitórios. Entretanto se possível, deve-se evitar o uso dos dois primeiros, enquanto que o terceiro, pode ser usado numa concentração de 1,0 g/l.

No tocante às diferentes fontes de nitrogênio testados, resultantes do desdobramento destas do meio BC, isto é: L-glutamina, KNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ e controle (BC) foi constatado que as três primeiras, atuando isoladamente, tiveram um efeito menor que as duas últimas, porém o controle, teve um efeito mais estimulante que a penúltima.

Com respeito à renovação do meio, foi renovado parcialmente duas vezes por semana, sendo que, em cada renovação, 40% do mesmo, foi substituído por meio fresco. Em geral, cada tratamento foi iniciado por 10 ml de suspensão celular, aproximadamente 36 mg de matéria seca, sendo que, os erlenmeyers de 250 ml com 50 ml de meio BC, foram mantidos

em agitação mecânica, 120 rpm, sem luz e temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

(3) - No que diz respeito ao plaqueamento, foi estabelecido o meio **MSP**, meio **MS** modificado, cuja composição foi: **sais: MS. Vitaminas: BC**, porém, autoclavadas. **Orgânicos** (mg/l): inositol 100,00; sacarose PA 20.000,00, caseína hidrolisada 500,00 e Difco-ágar 5.600,00. **Hormônios** (mg/l): ANA 1,0 e BAP 0,5 respectivamente.

As células foram inoculadas via seringa ou "mistura" de volumes (x ml de meio morno com ágar + y ml de suspensão celular). No primeiro caso, 2,0 ml de suspensão foram aplicadas sobre o meio **MSP** já solidificado, enquanto que, no segundo procedimento 100 ou 80 ml de meio, antes de ser vertidos nas placas, foram misturados com 20 ml de suspensão. A contagem de microcalos, aos 45 dias, foi, quando possível, considerando o número deles por cm^2 em cada um dos quadrantes das placas. Esta metodologia de contagem, também é inédita na literatura, e ajusta-se melhor no caso de aplicar mistura de volumes, porque os microcalos ficam melhor distribuídos nas placas, são mais pequenos e na sua grande maioria, imersos no ágar, isto é, exatamente o contrário do outro procedimento que forneceu microcalos de maior tamanho, superficiais e em maior número, embora, estas características por um lado dificultaram a contagem, mas, por outro, facilitaram o isolamento das colônias para seu crescimento e regeneração, com base neste fato, verifica-se que o método de inoculação por seringa, é mais recomendável.

Por outro lado, e com relação aos microcalos imersos, foi verificado que sua reação, aos 45 dias, frente ao azul de tripano foi positiva, quer dizer, mantiveram alta viabilidade.

Das diferentes combinações testadas de ANA/BAP, foi escolhida a de 1,0 mg/l e 0,5 mg/l de ANA e BAP respectivamente, pelo fato de ter apresentado uma resposta mais regular nas placas.

Da competição do BAP com KIN e 2iP, na combinação ANA/citocinina 1,0/0,5 mg/l, autoclavadas ou ultrafiltradas, a combinação ANA/BAP, foi a que forneceu sempre, uma maior e mais regular resposta.

Em relação aos outros fatores testados, como: tamanho da placa e inoculação superficial sobre o meio solidificado com ágar. Foi verificado que ambos tamanhos (10 mm x 100 mm e 8 mm x 50 mm) proporcionaram um alto número de microcalos, porém, nas maiores, os calos foram mais desenvolvidos, sendo assim, este tipo de placa foi considerado mais vantajoso. Com respeito à inoculação superficial, não foi considerada apropriada, pelo baixo número de microcalos/cm² que forneceu.

Visando a regeneração os microcalos foram primeiramente estimulados a crescer através do meio MSR-1, MS modificado, cuja composição foi: sais: MS. Vitaminas: BC, porém, 1,0 mg/l. Orgânicos: MSP, porém com sacarose não PA e ágar Cialga.

(4) - Para induzir regeneração os calos foram colocados em meio MSR-1 com 10 e 20 mg/l de adenina, aos 30 e 60 dias respectivamente, após o qual, voltaram ao MSR-1. Curtas, finas, verdes e enoveladas brotações começaram a surgir dos calos.

Visando estimular o crescimento destas brotações, os calos foram transferidos para MSR-1 com maizena (amido de milho, 7%), efetivamente houve crescimento, mas este, também foi favorecido com MSR-1, 3% e 6% de sacarose não PA, sendo que, para o crescimento isolado das plântulas, MSR-1 6%, foi usado rotinamente.

Paralelamente a estes experimentos, a indução de brotações de calos friáveis envelhecidos foi testada com AgNO₃ e adenina. De fato, foi constatada regeneração em alguns tratamentos, mas, não no controle, onde não esteve presente este íon. Embora, tenha-se inferido o envolvimento de etileno, houve brotações, mas estas, foram esparsas e

não corresponderam às expectativas levantadas em função da literatura consultada. Por outro lado, não foi observado um efeito tóxico nos calos.

(5) - Com respeito à bulbificação, esta foi induzida a partir de plantas com uma altura de 10 a 15 cm de comprimento e meio **MSC**, o qual consistiu de: **sais: MS**, porém, macros/2 mais 170 mg/l de KH_2PO_4 e Fe-EDTA/2. **Vitaminas:** ausentes. **Orgânicos (g/l):** sacarose não PA 60,0 e ágar Cialga 5,6. **Hormônios:** ausentes. Foi observada não apenas bulbificação, como também aumento da massa foliar e enraizamento, mas, a bulbificação foi mais ostensiva ainda, quando as plantas foram inicialmente colocadas em meio **MSC** 6% de sacarose e 3,0 mg/l de AIB por 30 dias, após o qual as plantas, voltaram para **MSC** 6%.

Através do tempo, foi observado um crescimento da massa foliar e os bulbos induzidos, coletados, secos a temperatura ambiente e guardados em saquinhos de papel em espera de melhor época de plantio. Com base neste procedimento de bulbificação, foi inferido que o fotoperíodo de 16 h luz, não foi tão crítico quanto a alta concentração de sacarose em presença de AIB.

Finalmente as contaminações, especialmente a bacteriana, dificultaram no começo, o progresso dos trabalhos, mas, estas foram contornadas intensificando as medidas de precaução de assepsia na câmara de fluxo laminar.

REGENERATION FROM CELL SUSPENSION
CULTURES OF GARLIC (*ALLIUM SATIVUM L.*)

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum L.*) is a vegetable that is propagated exclusively by vegetative means and it is difficult therefore, to establish a classical breeding programme with genetic recombination through meiotic processes. Hence, in this specie, tissue culture is viewed as a viable alternative to induce and detect variability and/or mutations. Among the tissue culture techniques available, cell suspension and protoplast culture appear to be good systems for this kind of study. However, for garlic, no adequate methodology exists for plant regeneration from cell suspension or protoplast culture.

Considering that cell suspension is more versatile than the protoplast technique, the main objective of this research was to establish a cell suspension protocol that includes: production of friable calli (1), establish cells in liquid culture (2), callus induction by plating (3), plant regeneration (4) and bulb formation (5).

1. With regard to friable calli production, these were obtained from aged and compact cv. Chonan callus, using a MS modified medium denominated MSF and whose composition was: salts: MS; vitamins (1.0 mg/l): calcium pantothenate, pyridoxine - HCL, thiamine - HCL and nicotinic acid; organic (mg/l): inositol 100.00, casein hydrolysate 250.00, sucrose non-PA 30.000,00, hormones: 2,4-D 1,0 mg/l.

2. BC basal medium was used to establish the cell suspension cultures. This was a modification of the MS medium, whose composition was: salts: MS, except $\text{NH}_4\text{NO}_3/3$ and FE-EDTA/2; vitamins: as in MSF, but at 3.0 mg/l; organics (mg/l): inositol 100.00, sucrose P.A. 20.000,00, L-glutamine 146.00; hormones: 2,4-D and BAP 0.5 mg/l respectively. The hormones,

L-glutamine and vitamins were sterilfiltered through a cellulose acetate membrane with 0.22 um pore size.

Determination of the growth curve of the cell population was made by measuring externally, with a ruler, the diameter of the cell population sediment inside the erlenmeyer flask. This new method produced growth curves very similar to those found in the literature based on dry weight, fresh weight or cell counts.

The combinations of hormones in the **BC** basal medium, were selected from several combinations of 2,4-D/BAP of which 0.0/0.5, 0.5/0.5 and 1.0/0.5 mg/l produced very similar growth curves, stimulating the growth of the cell populations more than any other treatment. The second combination was adapted as the standard hormone combination for the **BC** basal medium since it represents the lowest concentration of bath plant growth regulators.

With regard to other non-hormonal factors included in the **BC** basal medium, it was noted that rifaldin, non-PA sucrose and MES, at the concentrations tested, did not produce inhibitory effects. However, if possible, the use of the first and second compounds should be avoided, while the third can be used at a concentration of 1.0 mg/l.

With regard to the different nitrogen sources tested along with the **BC** basal medium, that is: L-glutamine, KNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ and control (**BC**), it was observed that the first three, as sole sources, had a smaller effect than the last two sources, but the control had a greater stimulating effect than the penultimate source.

The medium was partially renewed twice a week whereby 40% of the medium was replaced by fresh medium.

In general, each treatment was initiated with 10 ml of cell suspension, containing approximately 36 mg dry weight, and the 250 ml erlenmeyer flasks containing 50 ml of **BC** medium were maintained on a

rotary shaker at 120 rpm at a temperature of $26 \pm 2^\circ\text{C}$ and without light.

3. For plating, a modified MS medium, MSP, was established whose composition was: salts: MS; vitamins: as BC, but autoclaved; organics (mg/l): inositol 100.00, sucrose PA 20.000,00, casein hydrolysate 500.00 and difco-agar 5.600,00; hormones (mg/l): NAA 1.0 and BAP 0.5 respectively.

The cells were inoculated by a syringe or by mixing (x ml of warm-agar + y ml of cell suspension).

In the first case, 2.0 ml of suspension culture was runned over MSP solidified medium while, in the second procedure, 100 or 80 ml of medium, before being poured onto the petri dish, was mixed with 20 ml of cell suspension. Microcalli were counted after 45 days, when possible, by considering the number per cm^2 in each quadrant of the petri dish. This method of counting is also new and more appropriate for the technique of mixing cells with medium where the calli are smaller and mostly distributed at the bottom of the petri dishes.

On the other hand, the syringe technique produced larger and more numerous calli distributed at the surface. This characteristic made counting more difficult but was the preferred technique because of the need to isolate the colonies for growth and regeneration studies.

On the other hand, submerged cell colonies at 45 days gave a positive reaction with trypan blue (unstained) indicating high viability.

Among different combinations of ANA/BAP tested, concentrations of 1.0 mg/l and 0.5 mg/l respectively were chosen for routine work, since these presented a better and more regular response.

With regard to BAP competition with KIN and 2iP autoclaved or ultrafiltered mixtures of NAA/cytokinin at 1.0/0.5 mg/l, NAA/BAP always

gave a greater and more regular response.

With regard to other factor tested such as dish size and superficial inoculation on agar-solidified medium, the following conclusions were reached both (10 mm x 100 mm and 18 mm x 50 mm) of petri dish provided large numbers of microcalli, but, with the larger petri dishes the calli were more developed and thus were considered better.

Inoculation on agar medium did not appear to be appropriate, because of the small number of microcalli/cm² that it produced.

For plant regeneration from microcalli, growth was first stimulated using **MSR-1** medium, **MS** modified as follows: salts: **MS**, vitamins: **BC**, except at, 1.0 mg/l; organics: **MSP**, but with non-PA sucrose and unpurified agar.

4. In order to induce plant regeneration from microcalli, these were transferred onto **MSR-1** with 10 and 20 mg/l of adenine, at 30 and 60 days respectively and afterwards returned to **MSR-1**. Short, fine, green, curly shoots began to emerge from the calli.

In order to stimulate shoot growth, the microcalli were transferred to **MSR-1** with "maizena" (7% commercial corn starch). Growth occurred but this was also favored by **MSR-1** with 3% and 6% of sucrose (non-PA). **MSR-1** with sucrose at 6% was used routinely for the growth of plantlets.

Parallel to these experiments, shoot induction from friable aged calli was tested with AgNO₃ plus adenine. Shoot regeneration was found in some treatments but not in the controls, where Ag was not present. Although the data pointed to ethylene involvement the effect was not consistent.

5. Bulbformation was induced in 10 to 15 cm young plants with **MSC**

medium, whose composition was: salts: **MS** except macronutrients/2 plus 170 mg/l of KH_2PO_4 and Fe-EDTA/2; vitamins: absent; organics (g/l): sucrose (non-PA) 60.00 and unpurified agar 5.6; hormones: absent.

Not only was bulbformation observed but increases in leaf mass and rooting were also found. Bulbformation was even more intense when the plantlets were first placed for 30 days in **MSC** medium with 6% of sucrose (non-PA) and then returned to **MSC** 6% sucrose only.

After some time, drying of the shoot mass was observed and the induced bulbs were harvested, dried at room temperature and stored in paper bags until the growing season.

The results of the bulbformation experiments suggest that, the 16 h photoperiod was not as important as a high sucrose concentration in the presence of AIB.

Finally, bacterial contamination was more difficult to avoid than fungal and while this was a problem initially, it could be avoided by more careful aseptic procedures in the laminar flow hood.

REFERÊNCIAS

- ABO EL-NIL, M. Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Sc. Lett.**, 9: 259-64, 1977.
- ARNISON, P.G. & BOLL, W.G. The effect of 2,4-D and kinetin on the morphology, growth, and cytochemistry of peroxidase of cotyledon cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. *contender*). **Can.J. Bot.**, 54: 1847-56, 1976.
- BALAGUÉ, C.; LATCHÉ, A.; FALLOT, J. & PECH, J.C. Some physiological changes occurring during the senescence of auxin-deprived pear cells in culture. **Plant Physiol**; 69: 1339-43, 1982.
- BANTHORPE, D.V. & BROWN, G.D. Growth and secondary metabolism in cell cultures of *Tanacetum mentha* and *Anethum* species in buffered media. **Plant Science**, 67: 107-13, 1990.
- BECK, E. & RENNER, U. Ammonium triggers uptake of NO_3^- by *Chenopodium rubrum* suspension culture cells and remobilization of their vacuolar nitrate pool. **Plant Cell Physiol.**, 30: 487-95, 1989.
- BELLINI, C.; CHUPEAU, M.CH.; GERVAIS, M.; VASTRA G. & CHUPEAU, Y. Importance of myo-inositol, calcium, and ammonium for the viability and division of tomato (*Lycopersicon esculentum*) protoplasts. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, 23: 27-37, 1990.
- BENNICI, A.; CAFFARO, L.; DAMERI, R.M.; GASTALDO, P. & PROFUMO, P. Callus formation and plantlet regeneration from *Triticum durum* Desf. embryos. **Euphytica**, 39: 255-63, 1988.
- BERGER, R.G.; DRAWERT, F. & KUNZ, CH. Isozymes in nutrient medium of suspension-cultured apple cells (*Malus sylvestris* Mill.). **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, 15: 137-47, 1988.

- BERLYN, M.B. & ZELITCH, I. Photoautotrophic growth and photosynthesis in tobacco callus cells. **Plant Physiol.**, 56: 752-56, 1975.
- BIDWELL, R.G.S. Nitrogen metabolism. In: ————. **Plant physiology**. 22 ed. New York, Macmillan Pub. Co., 1979a. Cap. 8, p.193-227.
- BIDWELL, R.G.S. Uptake and transfer of solutes. In: ————. **Plant Physiology**. 2 ed. New York, Macmillan Pub. Co., 1979b. Cap. 12, p.287-302.
- BIDWELL, R.G.S. Interpretation of growth and development. In: ————. **Plant Physiology**. 2 ed. New York, Macmillan Pub. Co., 1979c. Cap. 16, p.379-407.
- BIER, O. Bacilos esporulados Gram-positivos. In: ————. **Microbiologia e imunologia**. 30 ed. São Paulo, Melhoramento, 1990. Cap. 33, p.665-91.
- BINAROVÁ, P.; NEDELNIK, J.; FELLNER, M. & NED-BALKOVA, B. Selection of resistance to filtrates of *Fusarium spp.* embryogenic cell suspension culture of *Medicago sativa* L.. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, 22: 191-96, 1990.
- BISTER-MIEL, F.; GUIGUARD, J.L. & AGIER, C. Action compensatrice de la glutamine sur la croissance des cellules végétales in vitro. **Bull Soc. Bot. Fr.**, 1: 5-14, 1985.
- BONATELLI, R.JR.; AZEVEDO, J.L. & VALENT, G.U. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. **Rev. Brasil. Genet.**, 6: 399-405, 1983.
- BOUCAUD, M.T.; BALAGUÉ, C. & GOULTIER, J.M. Shift in variability of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-deprived pear cell suspensions. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, 22: 173-78, 1990.

- BRACHO, G. & WHITAKER, J.R. Purification and partial characterization of potato (*Solanum tuberosum*) invertase and its endogenous proteinaceous inhibitor. **Plant Physiol.**, 92: 386-94, 1990.
- BUTENKO, R.G. Laboratory and equipment. In: ————. **Plant Tiss. Cult. and Plant Morphogenesis**. Jerusalem, Israel Program for Scientific Translation Ltd., 1968a. Cap. 1, p.23.
- BUTENKO, R.G. Nutrition of tissue cultures. In: ————. **Plant Tiss. Cult. Plant Morphogenesis**. Jerusalem, Israel Program for Scientific Translation Ltd., 1968b. Cap. 2, p.25-53.
- BUTENKO, R.G. Methods for isolation of plant tissue and their cultivation in vitro. In: ————. **Plant Tiss. Cult. and Plant Morphogenesis**. Jerusalem, Israel. Program for Scientific Translation Ltd., 1968c. Cap. 3, p.76.
- CARLSON, P.S. The use of protoplast for genetic research. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, 70: 598-602, 1973.
- CARVALHO, M.G. Viroses do alho. **Inf. Agrop.**, 12: 41-45, 1986.
- CHALEFF, R.S. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. **Science**, 219: 676-82, 1983.
- CHANG, L.A., HAMMETT, L.K. & PHARR, D. Carbon dioxide effects on ethanol production, pyruvate decarboxylase, and alcohol dehydrogenase activities in anaerobic sweet potato roots. **Plant Physiol.**, 71: 59-62, 1983.
- CHIA, T.A.; HEW, C.S. & LEE, Y.K. Cell suspension culture of *Hedyotis* spp. **Bot. Gaz.**, 149: 376-81, 1988.
- CHI, G.L. & PUA, E.CH. Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris ssp. Chinensis*

- (Chinese cabbage) in vitro. *Plant Sci.*, 64: 243-50, 1989.
- CHIBBAR, R.N.; CELLA, R.; ALBANI, D. & HUYSTEE, R.B. BAN. The growth of and peroxidase synthesis by two carrot cell lines. *J. Exp. Bot.*, 35: 1846-52, 1984.
- COLIJN, C.M.; KOOL, A.J. & NIJKAMP, H.J.J. An effective chemical mutagenesis procedure for *Petunia hybrida* cell suspension cultures. *Theor. Appl. Genet.*, 55: 101-06, 1979.
- CRAWFORD, R.M. & BAINES, M.A. Tolerance of anoxie and the metabolism of ethanol in tree roots. *New Phytol.*, 79: 519-26, 1977.
- CROSS, J.W. Auxin action: the search for the receptor. *Plant Cell and Environ.*, 8: 351-59, 1985.
- DALKIN, K.; EDWARDS, R.; EDINGTON, B. S.; DIXON, R.A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). I. Introduction of phenylpropanoid biosynthesis and hydrolytic enzymes in elicitor - treated cell suspension cultures. *Plant Physiol.*, 92: 440-46, 1990.
- DAVIES, B.D. & DULBECCO, R. Estrutura bacteriana. In: ——— & ———. *Microbiologia de Davies. Fisiologia e genética bacterianas.* 2 ed. São Paulo, Harper & Row do Brasil, 1979. Cap.2, p. 24-43.
- DAVIES, P.J. Plant hormones and their role in plant growth and development. Dardrecht, Marinus Nijhoff. Pub. 1987. 681 p.
- DECALLONNE, J.R. & MEYER, J.A. Effect of benomyl on spores of *Fusarium oxysporum*. *Phytochemistry*, 11: 2155-60, 1972.
- DODDS, J.H. & ROBERTS, L.W. Aseptic techniques. In: ——— & ———. *Experiments in plant tiss. cult.* Cambridge, Cambridge Univ. Press., 1983a. p. 10-20.

- DODDS, J.H. & ROBERTS, L.W. Nutricional component of tissue culture media. In: ——— & ———. **Experiments in plant tiss.cult.** Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1983b. p.21-35.
- DODDS, J.H. & ROBERTS, L.W. Liquid media: root cultures and cell suspensions. In: ——— & ———. **Experiments in plant tissue culture.** Cambridge, Cambridge University Press, 1983c. p.50-65.
- DODDS, J.H. & ROBERTS, L.W. Isolation, purification and culture of protoplasts. In: ——— & ———. **Experiments in plant tiss. cult.** Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1983d. p.107-126.
- DODDS, J.H. & ROBERTS, L.W. Quantitation of tissue culture procedures. In: ——— & ———. **Experiments in plant tiss. cult.** Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1983E. p.149-161.
- DRIVERS, J.A. & SUTTLE, G.R.L. Nursery handling of propagules. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry.** Dordrecht, Martinus Nijhoff Pub., 1987. p.320-35.
- DUBOIS, J.; DROUJININSKI, A. & VASSEUR, J. Croissance et potentialités organogénese de suspensions cellulaires de *Cichorium intybus* L. var. Witloof. **Bull. Soc. Bot. Fr.**, 415: 311-22, 1988.
- DURZAN, D.J. Ammonia: its analogues, metabolic products and site of action in somatic embryogenesis. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (Eds.) **Cell and tiss. cult. in forestry.** Dordrecht, Martinus Nijhoff Pub., 1987. p.93-136.
- DYER, W.E.; WELLER, S.C.; BRESSAN, R.A. & HERMMANN, K.M. Glyphosate tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Plant Physiol.**, 88: 661-66, 1988.
- EL-GIZAWY, A.M. & FORD-LLOYD, B.V. An in vitro method for the conservation and storage of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm.

- Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 9: 147-50, 1987.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. Brasília, 1984. 16 p. (Instruções Técnicas, 2).
- ERIKSSON, T. Studies on the growth requirements and growth measurement of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. **Physiol. Plant.**, 18: 976-93, 1965.
- ESAKA, M.; IMAGI, J.; SUZUKI, K. & KUBOTA, K. Formation of ascorbate oxidase in cultured cells. **Plant Cell Physiol.**, 29: 231-35, 1988.
- EVANS, D.A. & BRAVO, J.E. Protoplast isolation and culture. In: **Handbook of plant cell culture**. New York, Macmillan Pub. Co., 1983. V.I. p.124-76.
- EVANS, D.A.; CROCOMO, O.J. & CARVALHO, M.T.V. DE. Protoplast isolation and subsequent callus regeneration in sugarcane. **Z. Pflanzenphysiol.**, 98: 355-58, 1980.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R. & MEDINA FILHO, H. P. Somaclonal and gametoclinal variation. **Amer. J. Bot.**, 6: 759-74, 1984.
- EVERS, P.W. Correlation within the tree. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publisher, 1987. p.218-44.
- FALKINER, F.R. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. **IAPTC Newsletter**, 60: 13-23, 1990.
- FEDOROFF, S. Proposed usage of animal tissue culture terms. **J. Natl. Cancer Inst.**, 38: 607-11, 1967.
- FERREIRA, C.M. Cultura de tecidos de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. São Paulo, USP/Instituto de Biociência, 1985. 111p. (Tese de

Mestrado).

- FILGUEIRA, F.A.R. Alho: um desafio nacional. In: ————. **Manual de olericultura**. Cultura e comercialização de hortaliças. São Paulo, Ceres, 1982. V.2. p.105.
- FINER, J.J.; NAGASAWA, A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max Merrill.*). **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, 15: 125-36, 1988.
- FLICK, C.E.; EVANS, D.A. & SHARP, W.R. Organogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP W.R.; Ammirato, P. & Yamada, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York, Macmillan Publishing Comp., 1983, V.I.
- FLOH, E.I.S. Cultura de tecidos de medula caulinar de plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 de diferentes níveis de ploidia: aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos e cito-histológicos. São Paulo, USP/Instituto de Biociências, 1983. 183 p. (Tese de Doutorado).
- FOWLER, M.W. Large-scale cultures of cells in suspension. In: VASIL, Y.K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetic of plants**. Orlando, Acad. Press, 1984. V.I. p.168.
- FRESHNEY, R.I. Introduction: principles of steril technique and cell propagation. In: ———— (Ed.). **Animal cell culture: a practical approach**. Oxford, Irl Press, 1987. p.1-11.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. Nutrient requeriments of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell Res.**, 50: 151-58, 1968.
- GAMBORG, O.L. & SHYLUK, J.P. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. **Plant Physiol.**, 45: 598-600, 1970.

- GAMBORD, O.L. & WETTER, L.R. Appendix 1. Composition of mineral salt media for plant tissue and cell culture. In: ——— & ———. **Plant tiss. Cult. methods.** Ottawa, Nat. Res. Council of Canada, 1975. p.90.
- GALSTON, A.W. Polyamines as modulators of plant development. **BioScience**, 33: 382-87, 1983.
- GATENBY, A.A. The expression of eukaryotic genes in bacteria and its application to plant genes. In: MANTELL, S.H. & SMITH, H. (Eds.). **Plant biotechnology.** Cambridge, Cambridge University Press, 1983. p.269-97.
- GIAQUINTA, R. Sucrose hydrolysis in relation to phloem translocation in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol.** 60: 339-343, 1977.
- GORDON-KAMM, W.J.; SPENCER, T.M.; MANGANO, M.L.; ADAMS, T.R.; AINES, R.J.; STAR, W.G.; O'BRIEN, J.V.; CHAMBERS, SH.A.; WHITNEY, R. ADAMS, JR.; WILLETS, N.G.; RICE, T.B.; MACKEY, C.J. KRUEGER, R.W.; KAUSCH, A.P. & LEMAUX, P.G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell**, 2:603-18, 1990.
- GREY, G.; STEPAN-SARKISSIAN, G. & FOWLER, M.W. Biochemistry of forest tree species in culture. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry.** Dordrecht, Martinus Nijhoff Pub., 1987. p.31-60.
- HAYFLICK, L. The limited "in vitro" lifetime of human diploid cell strains. **Exp. Cell. Res.**, 37: 614-36, 1965.
- HORSCH, R.B. Quantitative plating technique. In: VASIL, J.K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetic of plants.** Orlando, Acad. Press, 1984. V.1. p.191-98.
- HORSCH, R.B. & KING, J. Measurement of cultured plant cell growth on

- filter paper discs. *Can. J. Bot.*, **58**: 2402-06, 1980.
- HUBER, J.; CONSTABEL, F. & GAMBORG, O.L. A cell counting procedure applied to embryogenesis in cell suspension cultures of anise (*Pimpinella anisum L.*). *Plant Sci. Lett.*, **12**: 209-15, 1978.
- HUSSEMAN, W. & BARZ, W. Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Physil. Plant.*, **40**: 77-81, 1977.
- HUSSEY, G. & STACEY, N.J. In vitro propagation of potato (*Solanum tuberosum L.*). *Ann Bot.*, **48**: 787-96, 1981.
- HUXTER, T.; REID, D.M. & THORPE, T.A. Ethylene production by tobacco (*Nicotiana tabacum*) callus. *Physiol. Plant.*, **46**: 374-80, 1979.
- ILLG, R.D. & SIQUEIRA, W.J. Variação somaclonal em alho. *Inf. Agrop.*, **12**: 12-7, 1986.
- ILLG, R.D. Variação somaclonal. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (Ed.) *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP E EMBRAPA/CNPH, 1990. p.287-95.
- JACOBSEN, J.V. & CHANDLER, P.M. Gibberellin and abscisic acid in germinating cereals. In: DAVIES, P.J. (Ed.). *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publisher, 1987. p.164-93.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J.L. & ADELBERG, E.A. The growth and death of microorganism. In: ——— & ———. *Review of medical microbiology*. 8 ed. California, Lange Medical Pub., 1968. Cap. 3, p.80-7.
- KANABUS, J.; BRESSAN, R.A. & CARPITA, N.C. Carbon assimilation in carrot cells in liquid culture. *Plant Physiol.*, **82**: 363-68, 1986.

- KAO, K.N. & MICHAYLUK, M.R. Nutricional requeriments for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. **Planta**, 126: 105-10, 1975.
- KEHR, A.E. & SCHAEFFER, G.W. Tissue culture and differentiation of garlic. **HortScience**, 11: 422-23, 1976.
- KING, P.J.; MANSFIELD, K.J. & STREET, H.E. Control of growth and cell division in plant cell suspension cultures. **Can. J. Bot.**, 51: 1807-17, 1972.
- KING, P.K. Induction and maintenance of cell suspension cultures. In: VASIL, Y.K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetic of plants**. Orlando, Acad. Press, 1984, V.1. p.130-37.
- KIRBY, E.G. The effects of organic nitrogen sources on growth of cell cultures of Douglas-fir. **Physiol. Plant.**, 56: 114-17, 1982.
- KOBAYASHI, S.; SAKAI, A. & OIYAMA, I. Cryopreservation in liquid nitrogen of cultured navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) nucellar cells and subsequent plant regeneration. **Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.**, 23: 15-20, 1990.
- KOORNNEEF, M.; DIEPEN, J.A.M.; HANHART, C.J.; KIEBOOM-DE WAART, A.C.; MARTINELLI, L.; SCHOENMAKER, H.C.H. & WIJBRANDI, J. Chromosomal instability in cell and tissue cultures of tomato haploids and diploids. **Euphytica**, 43: 179-86, 1989.
- KOYAMA, H.; OJIMA, K. & YAMAYA, T. Utilization of anhydrous aluminum phosphate as a sole source of phosphorus by a selected carrot cell line. **Plant Cell Physiol.**, 3: 173-77, 1990.
- KUBEK, D.J. & SHULER, M.L. A rapid quantitative method to measure growth of plant cell suspension cultures. **Can. J. Bot.**, 56: 2340-43, 1978a.

- KUBEK, D.J. & SHULER, M.L. On the generality of methods to obtain single-cell plant suspension cultures. *Can. J. Bot.*, **56**: 2521-27, 1978b.
- KUMAR, P.P.; RAJU, C.R.; CHANDRAMOHAN, M. & IYER, R.D. Induction and maintenance of friable callus from the cellular endosperm of *Cocos nucifera* L. *Plant Sci.*, **40**: 203-07, 1985.
- LANDRY, L.G. & SMYTH, D.A. Characterization of starch produced by suspension cell cultures of indica rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, **15**:23-32, 1988.
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. *Somaclonal variation* - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, **60**: 147-214, 1981.
- LEE, M. & PHILLIPS, R.L. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **39**: 413-37, 1988.
- LEHNINGER, A.L. Réplica y transcripción del DNA. In ————. *Bioquímica*. Omega. Barcelona, 1974. pag.724.
- LEIFERT, C. & WAITER, W.M. Contaminants of plant tissue cultures. *IAPTC NEWSLETTER*, **60**: 2-13, 1990.
- LEOPOLD, A.C. & KRIEDEMANN, P.E. The dynamics of growth. In: ———— & ————. *Plant growth and development*. 2^o ed. New Delhi, McGraw-Hill, 1975. Cap. 3, p.77-105.
- LI, Z.S.; ATTIAS, J. & THELLIER, M. Filtration stress-induced variations of peroxidase activity in cell suspension cultures of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) cells. *Physiol. Plant.*, **78**: 22-8, 1990.
- LIEBERMANN, M. Biosynthesis and action of ethylene. *Ann. Rev. Plant*

Physiol., 30: 533-91, 1979.

LU, CH. Y.; VASIL, V. & VASIL, Y.K. Isolation and culture of protoplast of *Panicum maximum* Jacq (Guinea grass): Somatic embryogenesis and plantlet formation. *Z. Pflanzenphysiol.*, 104: 311-18, 1981.

LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18: 100-27, 1965.

MAGALHÃES, J.R. Nutrição mineral do alho. *Inf. Agrop.*, 12: 20-30, 1986.

MALIGA, P. Isolation and characterization of mutants, in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 519-42, 1984.

MANFORD, K. & PATTERSON, J.R. Measurement of growth and viability of cell in culture. *Methods in enzymology*, 58: 141-50, 1979.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A. & MCKEE, R.A. Crop breeding. In: ———; ——— & ———. **Principles of plant biotechnology: an introduction to genetic engineering in plant.** Oxford, Blackwell, 1985. p.158-85.

MARETZKI, A.; CRUZ, A. DELA & NICKELL, L.G. Extracellular hydrolysis of starch in sugarcane cell suspensions. *Plant Physiol.*, 48: 521-25, 1971.

MARQUES, I.A. & BRODELIUS, P.E. Elicitor induced L-tyrosine decarboxylase from plant cell suspension cultures. I. Induction and purification. *Plant Physiol.*, 88: 46-51, 1988.

MARTIN, S.M. & ROSE, D. Growth of plant cell (*Ipomoea*) suspension cultures at controlled pH levels. *Can. J. Bot.* 54: 1264-45, 1976.

MARTON, L. & MALIGA, P. Control of resistance in tobacco cell to 5-bromodeoxyuridine by a simple mendelian factor. *Plant Sci. Lett.*,

5: 77-81, 1975.

MÁRTON, L.; DUNG, T.M.; MENDEL, R.R. & MALIGA, P. Nitrate reductase deficient cell lines from haploid protoplast cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Mol. Gen. Genet.**, 182: 301-04, 1982.

MASCARENHAS, M.H.T. Controle de plantas daninhas na cultura de alho. **Inf. Agrop.**, 12: 31-3, 1986.

MASUDA, H.; TAKAHASHI, T. & SUGAWARA, SH. Acid and alkaline invertase in suspension cultures of sugar beet cells. **Plant Physiol.**, 86: 312-17, 1988.

McGAW, B.A. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: DAVIES, P.J. (Ed.). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht, Martinus Nijhoff Pub., 1987. p.76-93.

MEINS, F. Heritable variation in plant cell culture. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, 34: 327-46, 1983.

MEREDITH, C.P. Selection and characterization of aluminium - resistant variants from tomato cell cultures. **Plant Sci. Lett.** 12: 25-34, 1978.

MONTES DE OCA, M. Senescência celular? In: Simposio sobre culturas de células. **Anais**. São Paulo, Secretaria da Cultura, Ciência e Tecnologia, 1978. p.23-35. (Publicação ACIESP, 10).

MURAI, N.; TALLER, B.J.; ARMSTRONG, D.J. & SKOOG, F. Kinetic incorporated in to tobacco callus ribosomal RNA and transfer RNA preparations. **Plant Physiol.**, 60: 197-202, 1977.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, 15: 473-97, 1962.

- MURASHIGE, T. & NAKANO, R. Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells. *Amer. J. Bot.*, 54: 963-70, 1967.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 135-66, 1974.
- NAGASAWA, A. & FINER, J.J. Induction of morphogenetic callus cultures from leaf tissue of garlic. *HortScience*, 23: 1068-70, 1988.
- NAGASAWA, A. & FINER, J.J. Development of morphogenic suspension cultures of garlic (*Allium sativum L.*). *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 15: 183-87, 1988.
- NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. (Eds.). *Plant Cell, tiss., org. cult.* Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.185.
- NEGRUTIU, I.; JACOBS, M. & CABOCHE, M. Advances in somatic cell genetics of higher plants - the protoplast approach in basic studies on mutagenesis and isolation of biochemical mutants. *Theor. Appl. Genet.*, 67: 289-304, 1984.
- NETO, M.J.A. Alho: a procura de melhor qualidade. *Inf. Agrop.*, 12: 1, 1986.
- NETO, A.T.; MENDES, B.M. & ANDO, A. Indução e uso de mutações in vitro. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (Ed.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP e EMBRAPA/CNPH, 1990. p.341-78.
- NISHINARI, N. & SYONO, K. Changes in endogenous cytokinin levels in partially synchronized cultured tobacco cells. *Plant Physiol.*, 65: 437-41, 1986.

- NOVAK, F.J. The changes of karyotype in callus cultures of *Allium sativum* L. *Caryologia*, 27: 45-54, 1974.
- NOVAK, F.J. Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. *Z. Pflanzenzüchtg*, 84: 250-60, 1980.
- NOVAK, F.J. Chromosomal characteristic of long-term callus culture of *Allium sativum* L. *Cytologia*, 46: 371-79, 1981.
- NOVAK, F.J. Production of garlic (*Allium sativum* L.) tetraploids in shoot-tip in vitro culture. *Z. Pflanzenzüchtg*, 91: 329-33, 1983.
- NOVAK, F.J.; HAVEL, L. & DOLEZEL, J. *Allium*. In: SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A. & YAMADA, Y. (Eds.). *Handbook of Plant Cell Cult.* New York, Mac Millan, 1986. V.4. p.418-55.
- OLD, R.W. & PRIMROSE, S.B. *Principles of gene manipulation*. An introduction to genetic engineering. 3rd ed. Oxford, Blackwell Sci. Pub., 1986, 409 p.
- OWENS, L.D. Kanamycin promotes morphogenesis of plant tissues. *Plant Sci. Lett.*, 16: 225-30, 1979.
- PALLERONI, N.J. Crecimiento de las poblaciones bacterianas. In: ————. *Principios de microbiología*. Washinton, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, 1970. p.75-87. (Serie de Biología, monografía, nº 7).
- PHILLIPS, R.; ARNOTT, S.M. & KAPLAN, S.E. Antibiotic in plant tissue culture: rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. *Plant Sci. Lett.*, 21: 235-40, 1981.
- POLACCO, J.C. Arsenate as a potential negative selection agent for

- deficiency variants in cultured plant cells. *Plant*, **146**: 155-60, 1979.
- PRIMROSE, S.B. Principles of mammalian cell culture. In: ————. **Modern biotechnology**. Oxford, Blackwell, 1987. Cap. 8, p.97-104.
- PRIOLI, L. & SÖNDAHL, M.R. Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (*Zea mays* L.). **Biotechnology**, **7**: 589-94, 1989.
- RENNENBERG, H. & KAISER, W.M. Ion composition of tobacco cells cultured under sulfur deficiency. **Plant Cell Physiol.**, **30**: 325-33, 1989.
- REYNOLDS, J.F. & MURASHIGE, T. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. **In vitro**, **15**: 383-87, 1979.
- RHODES, C.A.; LOWE, K.S. & RUBY, K.L. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. **Biotechnology**, **6**: 56-60, 1988.
- ROMANI, R.J. Cell suspension cultures for the study of plant cell senescence. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (Eds.). **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987. p.390-404.
- ROUSTAN, J.P.; LATCHE, A. & FALLOT, J. Control of carrot somatic embryogenesis by AgNO_3 an inhibitor of ethylene action: effect on arginine decarboxylase activity. **Plant Sci.**, **67**: 89-95, 1990.
- RUYACK, J.; DOWNING, M.R.; CHANG, J.S. & MITCHELL, E.D. Growth of callus and suspension culture cells from cotton varieties (*Gossypium hirsutum* L.) resistant and susceptible to *anthomonas malvacearum* (E.F.SM.) Dows. **In vitro**, **15**: 368-73, 1979.
- SACRISTÁN, M.D. Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Walls. **Chromosoma**, **33**:

273-83, 1971.

SALISBURY, F.B. & ROSS, C. Absorption of mineral salts. In: ——— & ———. **Plant Physiology**. 3rd ed. Belmont, Wadsworth Pub. Co., 1985a. p.114-34.

SALISBURY, F.B. & ROSS, C. Assimilation of nitrogen and sulfur. In: ——— & ———. **Plant Physiology**. 3rd ed. Belmont, Wadsworth Pub. Co., 1985b. p.251-86.

SALISBURY, F.B. & ROSS, C. Growth and development. In: ——— & ———. **Plant physiology**. 3rd ed. Belmont, Wadsworth Pub. Co., 1985c. p.297-98.

SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. **Plant Physiology**. 3rd ed. Belmont, Wadsworth Pub. Co., 1985d. 540 p.

SALONEN, M.L. & SIMOLA, L.K. Effect of nitrate, ammonium and some amino acids in suspension cultures of *Atropa belladonna*. **Plant Cell Physiol.**, 30: 1177-81, 1989.

SCHAFFER, G. & HEBER, U. Glucose transport in to spinach chloroplasts. **Plant Physiol.**, 60: 286-89, 1977.

SCHMITZ, U. & LÖRZ, H. Nutrient uptake in suspension cultures of *Gramineae*. I. Development of an assay system. **Plant Sci.**, 66: 87-94, 1990.

SCHMITZ, U. & LÖRZ, H. Nutrient uptake in suspension cultures of *Gramineae*. II. Suspension cultures of rice (*Oriza sativa L.*). **Plant Sci.**, 66: 95-111, 1990.

SERESINHE, P.S.J.W. & OERTLI, J.J. Effects of boron on growth of tomato cell suspension. **Physiol. Plant.**, 81: 31-6, 1991.

- SERRENO-DAVÉ, G. Growth and differentiation of preadipocyte cell lines in serum-free medium. In: MATHER, J.P. (ed.). **Mammalian cell culture**. The use of serum-free hormone-supplemented media, New York, Plenum Press, 1984. Cap. 3, p.53-75.
- SHAH, R.R.; SUBBAIAH, K.V. & MEHTA, A.R. Hormonal effect on polyphenol accumulation in *Cassia* tissue cultured "in vitro". **Can J. Bot.**, 54: 1240-45, 1976.
- SHAHIN, E.A. & YASHAR, M. Factors influencing tomato protoplast development. In: HENKE, R.R.; CONSTANTIN, M.J. & HOLLAENDER, A. (Eds.) **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York, Plenum Press, 1985. p.75-82.
- SHEELER, P. & BIANCHI, D.E. Cell growth and proliferation. In: ——— & ———. **Cell and molecular biology**. 3rd ed. New York, John Wiley, 1987. Cap. 2, p.55-70.
- SHIMIZU, T.; CLIFTON, A.; KAMAMINE, A.; FOWLER, W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (Sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiol. Plant.**, 40: 125-29, 1977.
- SIDDIQUI, S.A.; ANSARI, M.Y.K. & AHMAD, R. Effect of 2,4-D on meiotic chromosomes of *Helianthus annuus* L. CV «peredovick» **Bull. Soc. Bot. Fr.**, 129: 91-4, 1982.
- SIGMA. Glutamine stability study. In: SIGMA. **Cell culture reagents**. (catalogue). St. Louis, 1991. p.202-04.
- SINGHA, S.; OBERLY, G.H. & TOWNSEND, F.C. Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, 11: 209-20, 1987.
- SKIRVIN, R.M. & JANICK, J. Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 101: 281-90, 1976.

- SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11: 118-30, 1957.
- SKOOG, F. Cytokinins in regulation of plant growth. In: SRB, A.M. (Ed.). *Genes, enzymes, and populations*. New York, Plenum Press, 1973. Cap. 11, p.147-84.
- SMOLENSKAYA, I.N.; NOSOV, A.V. & RALDUGINA, G.N. Broad bean cell suspension culture. *Soviet Plant Physiol.*, 35: 946-52, 1989.
- SODI, A.M.; PANIZZA, M. & TOGNONI, F. Studies on *Lavandin* callus culture: ethylene production in relation to the growth. *Biol. Plant.*, 31: 247-53, 1989.
- SPENCER, T.M.; GORDON-KAMM, W.J.; DAINES, R.J.; START, W.G. & LEMAUX, P.G. Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. *Theor Appl. Genet.*, 79: 625-31, 1990.
- SOUZA, R.J. DE & CASALI, V.W.D. Pseudoperfilhamento uma anormalidade genética fisiológica em alho. *Inf. Agrop.*, 12: 36-40, 1986.
- STOMMEL, J.R. & SIMON, P. Influence of 2-deoxy-D-glucose upon growth and invertase activity of carrot (*Daucus carota* L.) cell suspension cultures. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 16: 89-102, 1989.
- STREET, H.E. & OPIK, H. *The physiology plant: their growth and development*. London, Edward Arnold (Pub.) Ltd., 1970. 263 p.
- STREET, H.E. Cell (suspension) cultures techniques. In: ————. *Plant Tissue and Cell Culture*. 2^o ed. Oxford, Blackwell Sci. Pub., 1977. Cap. 4, p.61-102.
- STUCHBURY, T.; PALNI, L.M.; HORGAN, R. & WAREING, P.F. The biosynthesis

- of cytokinins in crown-gall tissue of *Vinca rosea*. **Planta**, 147: 97-102, 1979.
- SUNDERLAND, N. Nuclear cytology. In: STREET, H.E. (Ed.). **Plant Tissue and Cell Culture**. 2^o ed. Oxford, Blackwell Sci. Pub., 1977. Cap. 7, p. 177-205.
- SUNG, Z.R. Turbimetric measurement of plant cell culture growth. **Plant Physiol.**, 57: 460-62, 1976.
- SUTCLIFFE, J.F. & BAKER, D.A. Salt requirement. In: ——— & ———. **Plants and mineral salts**. London, Edward Arnold, 1974. p. 11-25.
- TAIRA, T.; HASKINS, F.A. & GORZ, H. Callus and suspension cultures of *Melilotus alba* tissues and cells. **Crop Sci.**, 17: 407-11, 1977.
- TAKEDA, R. & KATOH, K. Growth and sesquiterpenoid production by *Calypogeia granulata inoue* cells in suspension culture. **Planta**, 151: 525-30, 1981.
- TAVAZZA, R. & ANCORA, G. Plant regeneration from mesophyll protoplasts in commercial potato cultivars (Primura, Kennebec, Spunta, Desirée). **Plant Cell Report**, 5: 243-46, 1986.
- THIMANN, K.V. The naturally occurring auxins and their chemical relatives. In: ———. **Hormone action in the whole life of plants**. Amherst, Univ. Massachusetts Press, 1977. p.207-61.
- THOMPSON, L.M. Las arcillas, su acidez y alcalinidad. In: ———. **El suelo y su fertilidad**. 3^o ed. Barcelona. Reverté. 1965. Cap. 8, p.144-89.
- TREWAVAS, A. How do plant growth substances work? **Plant Cell and Environ.**, 4: 203-28, 1981.

- VASIL I.K. Plant cell culture and somatic cell genetic of cereals and grasses. In: ———; SCOWCROFF, W.R. & FREY, K.J. **Plant improvement and somatic cell genetic**. Orlando, Acad. Press, 1982. Cap. 9, p.179-203.
- VASIL, I.K. Somatic embriogenesis and its consequences in the *Gramineae*. In: HENKE, R.R.; CONSTANTIN, M.J. & HOLLAENDER, A. (Eds.) **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. New York, Plenum Press, 1985. p.31-47.
- VASIL, V.; WANG, D.Y. & VASIL, I.K. Plant regereation from protoplasts of napier grass (*Pennisetum purpureum* schum.) **Z. Pflanzenphysiol.**, III: 233-39, 1983.
- VASIL, V. & VASIL, I.K. Isolation and maintenance of embryogenic cell suspension cultures of *Gramineae*. In: VASIL, I.K. (Ed.) **Cell, Culture and Somatic Cell Genetic of Plants**. Orlando, Acad. Press, 1984. V.1. p.152-58.
- VASIL, V.; REDWAY, F. & VASIL, I.K. Regeneration of plants from embryogenic suspension culture protoplast of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Biotechnology**, 8: 429-34, 1990.
- VELILKY, I.A. & ROSE, D. Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. **Can. J. Bot.**, 51: 1837-44, 1973.
- VIEIRA, S. Apresentação tabular e gráfica dos dados. In: ———. **Introdução à bioestatística**. Rio de Janeiro, Campus Ltda, 1981. Cap. 2, p.29-49.
- VINCE-PRUE, D. Storage organs. In: ———. **Photoperiodism in plants**. London, McGraw-Hill Book Co., 1975. Cap. 12, p.385-405.
- WAN, Y.; SORENSEN, E.L. & LIANG, G.H. Genetic control of in vitro regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Euphytica**, 39:3-9,

1988.

WANG, C.Y.; CHENG, S.H. & SKAO, C.H. Senescence of rice leaves. **Plant Physiol.**, 69: 1348-49, 1982.

WEBER, G. & LARK, K.G. An efficient planting system for rapid isolation of mutants from plant cell suspensions. **Theor. Appl. Genet.**, 55: 81-6, 1979.

WERRY, P.A.TH.J. & STOFFELSEN, K.M. Conditions for a high plating efficiency of free cell suspension of *Haplopappus gracilis* (Nutt) Gray. **Theor. Appl. Genet.**, 51: 161-67, 1978.

WHITE, D.W.R. & VASIL, I.K. Use of amino acid analogue-resistant cell lines for selection of *Nicotiana sylvestris* somatic cell hybrids. **Theor. Appl. Genet.**, 55: 107-12, 1979.

WIDHOLM, J. Selection and characterization of amino acid analog resistant plant cell cultures. **Crop. Sci.**, 17: 597-600, 1977.

WILLIAMS, R.R.; TAJI, A.M. & WINNEY, K.A. The effect of *Ptilotus* plant tissue on pH of in vitro media. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, 22: 153-58, 1990.

WYSE, R. Sucrose uptake by sugar beet top root tissue. **Plant Physiol.**, 64: 837-41, 1979.

YAMADA, Y. & SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant Cell Physiol.**, 19: 691-99, 1978.

YEOMAN, M.M. & STREET, H.E. General cytology of cultured cells. In: STREET, H.E. (Ed.). **Plant Tissue and Cell Culture**. 2^o ed. Oxford, Blackwell Sci. Pub., 1977. Cap. 6, p.137-76.

YOUNG, P.M.; HUTCHINS, A.S. & CANFIELD, M.L. Use of antibiotics to

control bacteria in shoot cultures of woody plants. **Plant Sci. Lett.**, 34: 203-09, 1984.

YURIN, U.M. Prostaglandins in plants. **Soviet Plant Physiol.**, 37: 609-14, 1991.

ZINK, M.W. Regulation of ammonia-assimilating enzymes by various nitrogen sources in cultured *Ypomoea* spp. **Can. J. Bot.**, 67: 3127-33, 1989.

APÊNDICE I

QUADRO 1

Dados das médias de três diâmetros do sedimento celular, (mm), sob efeito de diferentes doses de 2,4-D/BAP (mg/l): 0,0/0,0, 0,0/0,5 e 0,5/0,0 com uma observação semanal e quatro repetições por dose.

Semanas	2,4-D	0,0		0,5		TOTAIS
	BAP	0,0	0,5	0,0	0,5	
0 (início)		7,67	12,00	9,67	8,67	
		8,33	12,00	9,67	9,00	
		8,67	10,00	9,33	8,67	
		8,33	12,00	8,67	11,00	
Total 0		33,00	46,00	37,34	37,34	153,68
1 ^a		11,67	18,00	20,00	21,33	
		14,67	15,00	19,67	24,33	
		15,00	16,67	20,33	24,67	
		14,00	15,00	19,00	22,00	
Total 1 ^a		55,34	64,67	79,00	92,33	291,34
2 ^a		24,67	22,00	25,00	34,00	
		25,33	20,00	30,00	35,00	
		27,67	20,00	25,00	37,00	
		27,67	20,00	28,00	34,67	
Total 2 ^a		105,34	82,00	108,00	141,00	436,34
3 ^a		26,00	25,00	25,00	38,33	
		26,00	25,00	30,00	36,33	
		26,00	30,00	25,00	42,00	
		27,67	28,00	28,00	36,67	
Total 3 ^a		105,67	108,00	108,00	153,33	475,00
4 ^a		26,00	32,00	25,00	37,33	
		26,00	35,00	28,00	38,67	
		25,67	40,00	25,00	39,33	
		28,00	31,67	30,00	38,67	
Total 4 ^a		105,67	138,67	108,00	154,00	506,34
5 ^a		26,00	32,00	25,00	38,00	
		26,00	35,00	28,00	38,33	
		25,67	39,67	25,00	39,67	
		28,00	35,67	30,00	38,00	
Total 5 ^a		105,67	142,34	108,00	154,00	510,01
TOTAL GERAL		510,69	581,68	548,34	732,00	2.372,71

QUADRO 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA I

Entre doses de 2,4D/BAP dentro de semanas.

Causas de variação	G.L.	SQ	QM	F
Semanas	5	6.419,5253	1.283,9051	30,674 **
2,4-D	1	368,0492	368,0492	8,793 *
BAP	1	675,4856	675,4856	16,138 *
Semana x 2,4-D	5	209,0403	41,8081	0,999 NS
Semana x BAP	5	332,1767	66,4353	1,587 NS
2,4-D x BAP	1	132,2347	132,2344	3,159 NS
Semanas x 2,4-D x BAP	5	209,2805	41,8561	12,317 **
Resíduo	72	244,6770	3,3983	—
Total	95	8.590,4693	—	—

S = 1,84; \bar{x} = 24,71; Cv = 7,46%

** = signifacativo 1%

* = significativo 5%

QUADRO 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA II, POR SEMANA

Semana (0) Início				
Causas de variação	G.L.	SQ	QM	F
2,4-D (Doses)	1	1,1664	1,1664	1,758 NS
BAP (Doses)	1	10,5625	10,5625	15,922 **
2,4-D x BAP	1	10,5625	10,5625	15,922 **
Resíduo	12	7,9612	0,6634	—
Total	15	30,2526	—	—

CV = 8,48%

Semana (0) Início			
Causas de variação	G.L.	SQ=QM	F
Entre 2,4-D dentro de BAP0,0	1	2,3544	3,549 NS
Entre 2,4-D dentro de BAP0,5	1	9,3745	14,130 **
Total 2,4-D, BAP	2	11,7289	—

Semana (0) Início			
Causas de variação	G.L.	SQ=QM	F
Entre BAP dentro 2,4-DO,0	1	21,1250	31,844 **
Entre BAP dentro 2,4-DO,5	1	0,0000	0,000 ns
Total BAP, 2,4-D	2	21,1250	—

Semana 1ª				
Causas de variação	G.L.	SQ	QM	F
2,4-D (Doses)	1	164,6089		88,210 **
BAP (Doses)	1	32,0922		17,197 **
2,4-D x BAP	1	1,0000		0,536 ns
Resíduo	12	22,3929	1,8661	—
Total	15	220,0940	—	—

CV = 7,50%

Semana 1ª			
Causas de variação	G.L.	QM	F
Entre 2,4-D dentro BAPO,0	1	69,9744	37,498 **
Entre 2,4-D dentro BAPO,5	1	95,3745	51,248 **
Total 2,4-D x BAP + 2,4-D	2	165,6089	—

Semana 1ª			
Causas de variação	G.L.	QM	F
Entre BAP dentro 2,4-DO,0	1	10,8811	5,831 *
Entre BAP dentro 2,4-DO,5	1	22,2111	11,902 **
Total 2,4-D x BAP + BAP	2	33,0922	—

Semana 2ª				
Causas de variação	G.L.	SQ	QM	F
2,4-D (Doses)	1	237,6222		82,330 **
BAP (Doses)	1	5,8322		2,021 NS
2,4-D x BAP	1	198,3873		68,737 **
Resíduo	12	34,6345	2,8862	—
Total	15	476,4762	—	—

CV = 6,23%

Semana 2ª			
Causas de variação	G.L.	QM	F
Entre 2,4-D dentro BAP0,0	1	0,8845	0,306 NS
Entre 2,4-D dentro BAP0,5	1	435,1250	14,942 **
Total 2,4-D x BAP + 2,4-D	2	436,0086	—

Semana 2ª			
Causas de variação	G.L.	QM	F
Entre BAP dentro 2,4-DO,0	1	68,0945	23,593 **
Entre BAP dentro 2,4-DO,5	1	136,1250	47,164 **
Total 2,4-D x BAP + BAP	2	204,2195	—

Semana 3ª				
Causas de variação	G.L.	SQ	QM	F
2,4-D (Doses)	1	141,9672		29,213 **
BAP (Doses)	1	141,9672		29,213 **
2,4-D x BAP	1	115,5625		23,780 **
Resíduo	12	58,3161	4,8597	—
Total	15	457,8131	—	—

CV = 7,43%

Semana 3ª			
Causas de variação	G.L.	QM	F
Entre 2,4-D dentro BAPO,0	1	0,6786	0,140 NS
Entre 2,4-D dentro BAPO,5	1	256,8511	52,852 **
Total 2,4-D x BAP + 2,4-D	2	257,5297	—

Semana 3ª			
Causas de variação	G.L.	QM	F
Entre BAP dentro 2,4-DO,0	1	0,6786	0,140 NS
Entre BAP dentro 2,4-DO,5	1	256,8511	52,853 **
Total 2,4-D x BAP + BAP	2	400,6250	—

Semana 4ª				
Causas de variação	G.L.	SQ	QM	F
2,4-D (Doses)	1	19,4922		3,431 NS
BAP (Doses)	1	390,0625		68,658 **
2,4-D x BAP	1	10,5625		1,859 NS
Resíduo	12	68,1740	5,6812	—
Total	15	488,2912	—	—

CV = 7,53%

Semana 4ª			
Causas de variação	G.L.	QM	F
Entre 2,4-D dentro BAP0,0	1	0,6786	0,119 NS
Entre 2,4-D dentro BAP0,5	1	29,3761	5,171 *
Total 2,4-D x BAP + 2,4-D	2	30,0547	—

Semana 4ª			
Causas de variação	G.L.	QM	F
Entre BAP dentro 2,4-D0,0	1	136,1250	23,961 **
Entre BAP dentro 2,4-D0,5	1	264,5000	46,557 **
Total 2,4-D x BAP + BAP	2	400,6250	—

Semana 5ª				
Causas de variação	G.L.	SQ	QM	F
2,4-D (Doses)	1	12,2325		2,759 NS
BAP (Doses)	1	427,1456		96,352 **
2,4-D x BAP	1	5,4405		1,227 NS
Resíduo	12	53,1984	4,4332	—
Total	15	498,0170	—	—

CV = 6,61%

Semana 5ª			
Causas de variação	G.L.	QM	F
Entre 2,4-D dentro BAP0,0	1	0,6785	0,153 NS
Entre 2,4-D dentro BAP0,5	1	16,9945	3,833 NS
Total 2,4-D x BAP + 2,4-D	2	17,6730	—

Semana 5ª			
Causas de variação	G.L.	QM	F
Entre BAP dentro 2,4-DO,0	1	168,0861	37,915 **
Entre BAP dentro 2,4-DO,5	1	264,5000	59,663 **
Total 2,4-D x BAP + BAP	2	432,5861	—

APÊNDICE II

QUADRO 1

Dados das médias de três diâmetros do sedimento celular, (mm), sob efeito de diferentes doses de 2,4-D/BAP (mg/l): 0.5/0.5, 1.0/0.5 e 2.0/0.5 com uma observação semanal e quatro repetições por dose.

2,4-D	0,5	1,0	2,0	TOTAIS
Semanas				
0 (Início)	8,67	10,33	8,33	
	9,00	10,67	8,67	
	8,67	11,67	10,00	
	11,00	9,67	9,67	
Total 0	37,34	42,34	36,67	116,35
1 ^a	21,33	18,67	15,33	
	24,33	18,67	16,00	
	24,67	18,00	17,67	
	22,00	21,00	18,67	
Total 1 ^a	92,33	76,34	67,67	236,34
2 ^a	34,00	31,67	25,33	
	35,00	32,33	27,33	
	37,33	30,67	26,00	
	24,67	33,67	26,33	
Total 2 ^a	131,00	128,34	104,99	364,33
3 ^a	28,33	36,00	28,67	
	36,33	35,33	30,67	
	42,00	35,00	30,00	
	36,67	35,33	28,00	
Total 3 ^a	143,33	141,66	117,34	402,33
4 ^a	27,33	36,00	29,33	
	28,67	35,33	29,67	
	39,33	35,00	29,67	
	38,67	35,00	29,67	
Total 4 ^a	134,00	141,33	118,34	393,67
5 ^a	28,00	36,00	29,33	
	38,33	35,00	29,67	
	39,67	35,00	29,67	
	38,00	35,33	29,67	
Total 5 ^a	144,00	141,33	118,34	403,67
TOTAL GERAL	682,00	671,34	563,35	1.916,69

QUADRO 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA I.

Doses de 2,4-D/BAP x semanas

Causas de variação	G. L.	SQ	QM	F
Semanas	5	5.803,4840	1.160,6968	142,877 **
Doses	2	359,0736	179,5368	22,097 **
Semanas x Doses	10	100,6531	10,0653	1,239 NS
Resíduo	54	438,7466	8,1249	—
Total	71	6.701,9573	—	—

QMR = 8,12; S = 2,850 \bar{X} = 26,62; CV = 10,71%

QUADRO 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA II.

Entre doses de 2,4-D/BAP dentro de semanas.

Causas de variação	G. L.	SQ	QM	F
Entre doses dentro semana 0	2	4,7998	2,3999	0,295 NS
Entre doses dentro semana 1	2	78,2471	39,1235	4,815 *
Entre doses dentro semana 2	2	102,4015	51,2007	6,302 **
Entre doses dentro semana 3	2	105,8109	52,9055	6,512 **
Entre doses dentro semana 4	2	68,9587	34,4793	4,244 *
Entre doses dentro semana 5	2	99,5087	49,7543	6,124 **
Total Semana x Dose + Doses	12	459,7267		

QMR = 8,1249; S = \pm 2,8504 \bar{X} = 26,6207; CV = 10,71%

QUADRO 4.

Contraste de médias: entre doses 2,4-D/BAP dentro de semanas.

Doses						
Semanas	0,5/0,5		1,0/0,5		2,0/0,5	
0	9,33	a	10,59	a	9,17	a
1	23,08	a	19,09	b	16,92	b
2	32,75	a	32,09	a	26,25	b
3	35,83	a	35,41	a	29,33	b
4	35,33	a	35,33	a	29,59	b
5	36,00	a	35,33	a	29,59	b

DMS = 3,77

Na horizontal as médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tuckey a 5%.

QUADRO 5.

Controle de médias: entre semanas dentre de doses 2,4-D/BAP.

Doses						
Semanas	0,5/0,5		1,0/0,5		2,0/0,5	
0	9,33	a	10,59	a	9,17	a
1	23,08	b	19,09	b	16,92	b
2	32,75	c	32,09	c	26,25	c
3	35,83	c	35,41	c	29,33	c
4	35,33	c	35,33	c	29,59	c
5	36,00	c	35,33	c	29,59	c

DMS = 6.77

Na vertical as médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tuckey a 5%.

APÊNDICE III

QUADRO I

Dados das médias de três diâmetros do sedimento celular, (mm), sob efeito de diferentes doses de MES (mg/l): 0,0, 0,5, e 1,0 com uma observação semanal e quatro repetições por dose.

MES	0,0	0,5	1,0	TOTAIS
Semanas				
0 (Início)	9,33 9,33 10,00 9,00	9,67 9,33 9,00 9,00	9,67 9,33 10,00 9,67	
Total 0	37,66	37,00	38,67	113,33
1 ^a	10,67 10,33 10,33 11,00	12,00 12,00 12,00 11,33	14,00 12,67 16,00 15,00	
Total 1 ^a	42,33	47,33	57,67	147,33
2 ^a	19,33 27,67 29,67 25,00	28,33 27,67 23,33 24,33	30,00 26,67 30,00 29,00	
Total 2 ^a	101,67	103,66	115,67	321,00
3 ^a	26,33 34,67 35,00 32,00	35,00 35,00 30,67 33,67	40,00 35,00 40,00 38,33	
Total 3 ^a	128,00	134,34	153,33	415,67
4 ^a	35,33 39,67 39,33 37,33	42,67 40,00 39,00 43,00	40,00 40,00 45,00 40,00	
Total 4 ^a	151,66	164,67	165,00	481,33
5 ^a	35,00 39,67 40,00 37,33	44,33 40,00 40,00 40,33	40,00 40,00 45,00 42,33	
Total 5 ^a	152,00	164,66	167,33	483,99
TOTAL GERAL	613,32	651,66	697,67	1.962,65

QUADRO 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA I

Doses de MES vs semanas

Causa de variação	GL	F
Doses	2	2,69 NS
Semanas	5	109,67 **
Doses x semanas	10	0,48 NS
Resíduo	54	
Total	71	—

$$SQR = 20,40 \quad S = 4,52 \quad \bar{x} = 27,25 \quad CV = 16,58\%$$

QUADRO 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA II

Entre doses de MES dentro de semanas.

Causa de variação	GL	F
Doses dentro da semana 0	2	0,00 NS
Doses dentro da semana 1	2	0,75 NS
Doses dentro da semana 2	2	0,70 NS
Doses dentro da semana 3	2	2,13 NS
Doses dentro da semana 4	2	0,71 NS
Doses dentro da semana 5	2	0,81 NS
Total doses + doses x semana	12	—

$$QMR = 20,40$$

APÊNDICE IV

QUADRO 1

Dados das médias de três diâmetros do sedimento celular, (mm), sob efeito de diferentes doses de rifaldin (mg/l): 0,0, 5,0, e 10,0 e 20,0 com uma observação semanal e quatro repetições por dose.

Rifaldin	0,0	5,0	10,0	20,0	TOTAIS
Semanas					
0 (início)	9,67 9,00 10,00 9,67	11,33 10,00 10,00 9,00	10,00 10,00 10,00 10,00	10,00 10,00 10,00 10,00	
Total 0	38,34	40,33	40,00	40,00	158,67
1 ^a	12,33 11,33 12,00 13,00	18,00 15,00 13,67 10,67	14,67 14,33 14,67 14,67	10,00 10,00 10,00 10,00	
Total 1 ^a	48,66	57,34	58,34	40,00	204,34
2 ^a	21,00 24,67 28,00 25,00	29,33 26,67 28,00 24,67	28,00 28,00 28,00 30,00	20,00 20,00 20,00 20,00	
Total 2 ^a	98,67	108,67	114,00	80,00	401,34
3 ^a	28,00 31,67 35,00 32,00	35,33 30,00 30,00 30,00	35,00 35,00 30,33 31,00	30,00 35,00 30,00 30,00	
Total 3 ^a	126,67	125,33	131,33	125,00	508,33
4 ^a	38,33 39,67 40,00 39,33	40,00 35,00 36,00 40,00	40,00 40,00 38,00 40,00	35,00 40,00 35,00 35,00	
Total 4 ^a	157,33	151,00	158,00	145,00	611,33
5 ^a	42,00 45,00 40,00 41,67	45,00 38,00 40,00 40,00	45,00 40,00 45,00 40,00	38,00 40,00 40,00 35,67	
Total 5 ^a	168,67	163,00	170,00	153,67	655,34
TOTAL GERAL	638,34	645,67	671,67	583,67	2.539,35

QUADRO 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA I

Doses de rifaldin vs semanas

Causa de variação	GL	F
Doses	3	14,79 **
Semanas	5	697,29 **
Doses x semanas	15	2,22 *
Resíduo	72	
Total	95	—

SQR = 3,85 S = 1,96 $\bar{x} = 26,45$ CV. = 7,4%

QUADRO 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA II

Entre doses de rifaldin dentro de semanas

Causa de variação	GL	F
Doses dentro da semana 0	3	0,05 NS
Doses dentro da semana 1	3	4,77 **
Doses dentro da semana 2	3	14,55 **
Doses dentro da semana 3	3	0,55 NS
Doses dentro da semana 4	3	2,41 NS
Doses dentro da semana 5	3	0,87 NS
Total doses + doses x semana	18	—

QMR = 3,85

QUADRO 4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA III

Entre semanas dentro de doses de rifaldin

Causa de variação	GL	F
Semanas dentro de dose 0	5	193,50 **
Semanas dentro de dose 5	5	159,91 **
Semanas dentro de dose 10	5	180,69 **
Semanas dentro de dose 20	5	169,85 **
Total Semanas + doses x semanas	20	—

QMR = 3,85

QUADRO 5

Contraste de médias: entre doses de rifaldin dentro de semanas.

Doses	0,0		5,0		10,00		20,00	
Semanas								
0	9,58	a	10,08	a	10,00	a	10,00	a
1	12,16	ab	14,33	b	14,58	b	10,00	a
2	24,67	b	27,17	bc	28,50	c	20,00	a
3	31,67	a	31,33	a	32,83	a	31,00	a
4	39,33	a	37,75	a	39,50	a	36,25	a
5	42,00	ab	40,75	ab	42,50	b	38,42	a

DMS = 3,65

Na horizontal as médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tuckey 5%.

QUADRO 6

Contraste de médias: Entre semanas dentro de doses de rifaldin.

Doses	0,0		5,0		10,00		20,00	
Semanas								
0	9,58	a	10,08	a	10,00	a	10,00	a
1	12,16	a	14,33	b	14,58	b	10,00	a
2	24,67	b	27,17	c	28,50	c	20,00	b
3	31,67	c	31,33	d	32,83	d	31,25	c
4	39,33	d	37,75	e	39,50	e	36,25	d
5	42,00	d	40,75	e	42,50	e	38,42	d

DMS = 4,06

Na vertical, as médias seguidas de mesma letra não, diferem entre si, pelo teste de Tuckey 5%.

APÊNDICE V

QUADRO 1

Dados das médias de três diâmetros do sedimento celular, (mm), sob efeito de diferentes fontes de Sacarose: PA e não PA com uma observação semanal e quatro repetições por fonte.

Sacarose	PA	não PA	TOTAIS
Semanas			
0 (início)	15,00	15,00	
	10,00	19,00	
	15,00	15,00	
	20,00	14,67	
Total 0	60,00	63,67	123,67
1 ^a	17,00	18,00	
	25,00	25,00	
	20,00	20,00	
	20,00	20,00	
Total 1 ^a	82,00	83,00	165,00
2 ^a	25,00	22,00	
	38,00	40,00	
	38,00	28,00	
	25,00	25,00	
Total 2 ^a	126,00	115,00	241,00
3 ^a	35,00	28,00	
	42,00	45,00	
	45,00	40,00	
	38,00	30,00	
Total 3 ^a	160,00	143,00	303,00
4 ^a	40,00	30,00	
	50,00	45,00	
	50,00	50,00	
	45,00	40,00	
Total 4 ^a	185,00	165,00	350,00
5 ^a	45,00	35,00	
	50,00	45,00	
	50,00	50,00	
	50,00	42,00	
Total 5 ^a	195,00	172,00	367,00
6 ^a	40,00	35,00	
	55,00	45,00	
	50,00	50,00	
	50,00	42,00	
Total 6 ^a	195,00	172,00	367,00
TOTAL GERAL	1.003,00	913,67	1.916,67

QUADRO 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA I

Fonte de sacarose vs semanas

Causa de variação	GL	F
Fonte	1	4,29 *X
Semanas	6	37,33 **
Doses x semanas	6	0,47 NS
Resíduo	42	
Total	55	—

$$\text{QMR} = 32,59 \quad S = 5,71 \quad \bar{x} = 34,40 \quad \text{CV} = 17,0\%$$

QUADRO 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA II

Entre fontes de sacarose dentro de semanas.

Causa de variação	GL	F
Fonte dentro da semana 0	1	0,05 NS
Fonte dentro da semana 1	1	0,01 NS
Fonte dentro da semana 2	1	0,46 NS
Fonte dentro da semana 3	1	1,09 NS
Fonte dentro da semana 4	1	1,51 NS
Fonte dentro da semana 5	1	1,94 NS
Fonte dentro da semana 6	1	1,94 NS
Total doses + doses x semanas	7	—

$$\text{QMR} = 32,59$$

QUADRO 4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA III

Entre semanas dentro de fonte de sacarose.

Causa de variação	GL	F
Semanas dentro de fonte PA	6	22,64 **
Semanas dentro de fonte não PA	6	14,49 **
Total Semanas + doses x semanas	12	—

$$\text{QMR} = 32,59$$

QUADRO 5

Contraste de médias: entre semanas dentro de fontes de sacarose.

Fontes			Não	
Semanas	PA		PA	
0	17,50	a	15,92	a
1	20,50	ab	20,75	ab
2	31,50	bc	28,75	bc
3	40,00	cd	35,75	cd
4	46,25	d	41,25	cd
5	48,75	d	43,00	d
6	48,75	d	43,00	d

DMS = 12,50

Na vertical, as médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tuckey 5%.

APÊNDICE VI

QUADRO 1

Dados das médias de três diâmetros do sedimento celular, (mm), sob efeito de diferentes fontes de Nitrogênio: L-glutamina, KNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$ e controle com uma observação semanal e quatro repetições por fonte.

Fontes Semanas	GLU	kNO_3	NH_4NO_3	$\text{KNO}_3 +$ NH_4NO_3	Controle	TOTAIS
0 (início)	10,00	10,00	10,67	10,00	10,00	
	10,00	10,00	12,00	10,00	10,00	
	10,00	8,67	10,00	10,00	10,00	
	10,00	10,00	10,00	12,00	10,00	
Total 0	40,00	38,67	42,67	42,00	40,00	203,34
1 ^a	15,00	15,00	15,00	15,00	13,00	
	15,00	15,00	15,00	15,00	14,00	
	15,00	15,00	14,00	16,00	14,00	
	15,00	15,00	15,00	15,00	13,00	
Total 1 ^a	60,00	60,00	59,00	61,00	54,00	294,00
2 ^a	22,00	20,00	21,00	25,00	20,67	
	22,00	20,00	22,00	28,00	25,67	
	23,00	20,00	20,00	20,00	25,00	
	23,00	20,00	20,00	28,00	28,00	
Total 2 ^a	90,00	80,00	83,00	101,00	99,34	453,34
3 ^a	24,33	26,00	25,00	32,00	35,00	
	27,00	25,00	27,00	32,00	38,00	
	27,00	25,00	25,00	28,00	38,00	
	25,00	25,00	26,00	35,00	40,00	
Total 3 ^a	103,33	101,00	103,00	127,00	151,00	585,33
4 ^a	27,00	27,00	28,00	38,00	40,00	
	28,00	26,00	30,00	38,00	45,00	
	28,00	29,90	28,00	32,00	45,00	
	28,00	28,00	30,00	38,00	45,00	
Total 4 ^a	111,00	110,90	116,00	146,00	175,00	658,90
5 ^a	28,00	28,00	30,00	40,00	40,00	
	10,00	28,00	30,00	40,00	45,00	
	30,00	30,00	30,00	35,00	45,00	
	30,00	28,00	28,00	40,00	45,00	
Total 5 ^a	98,00	114,00	118,00	155,00	175,00	660,00
TOTAL	502,33	504,57	521,67	632,00	694,34	2.854,91

QUADRO 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA I

Fontes de nitrogênio vs semanas

Causa de variação	GL	F
Doses	4	111,47 **
Semanas	5	743,21 **
Doses x semanas	20	18,18 **
Resíduo	90	
Total	119	—

$SQR = 2,62$ $S = 1,62$ $\bar{x} = 23,95$ $CV = 6,7\%$

QUADRO 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA II

Fonte de nitrogênio dentro de semanas

Causa de variação	GL	F
Doses dentro da semana 0	4	0,25 NS
Doses dentro da semana 1	4	0,73 NS
Doses dentro da semana 2	4	8,45 **
Doses dentro da semana 3	4	45,15 **
Doses dentro da semana 4	4	75,97 **
Doses dentro da semana 5	4	71,82 **
Total Fontes + Fonte x semana	24	—

$QMR = 2,62$

QUADRO 4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA III

Semanas dentro de fontes de nitrogênio

Causas de variação	GL	F
Semanas dentro de fontes GLU	5	90,56 **
Semanas dentro de fontes KNO ₃	5	86,91 **
Semanas dentro de fontes NH ₄ NO ₃	5	91,94 **
Semanas dentro de fontes KNO ₃ + NH ₄ NO ₃	5	201,72 **
Semanas dentro de Controle	5	344,72 **
Total semanas + fontes x semana	25	—

QMR = 3,85

QUADRO 5

Contraste de médias: entre fontes de nitrogênio dentro de semanas

Fontes	GLU		KNO ₃		NH ₄ NO ₃		KNO ₃ + NH ₄ NO ₃		Controle	
Semanas										
0	10,00	a	9,67	a	10,67	a	10,50	a	10,00	a
1	15,00	a	15,00	a	14,75	a	15,25	a	13,50	a
2	22,55	ab	20,00	b	20,75	b	25,25	a	24,83	a
3	25,83	c	25,25	c	25,75	c	31,75	b	37,75	a
4	27,75	c	27,72	c	29,00	c	36,50	b	43,75	a
5	29,50	c	28,50	c	29,50	c	38,75	b	43,75	a

DMS = 3,19

Na horizontal, as médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tuckey 5%.

QUADRO 6

Contraste de médias: entre semanas dentro de fontes de nitrogênio.

Fontes							$\text{KNO}_3 +$	
Semanas	GLU		kNO_3		NH_4NO_3		NH_4NO_3	
0	10,00	a	9,67	a	10,67	a	10,50	a
1	15,00	b	15,00	b	14,75	b	15,25	b
2	22,55	c	20,00	c	20,75	c	25,25	c
3	25,83	cd	25,25	d	25,75	d	31,75	d
4	27,73	de	27,72	d	29,00	e	36,50	e
5	29,50	e	28,50	d	29,50	e	38,75	e

Continuação

Fontes		
Semanas	Controle	
0	10,00	a
1	13,50	b
2	24,83	c
3	37,78	d
4	43,75	e
5	43,75	e

DMS = 3,34

Na vertical, as médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tuckey 5%.