

CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE TECIDOS DE JOJOBA, SIMMONDSIA CHINENSIS (LINK) SCHNEID, IN VITRO (*)

RDO. GLADSTONE MONTE ARAGÃO **
LE MOYNE HOGAN ***

Jojoba é um arbusto nativo do deserto de Sonora, que cobre partes da Califórnia, Arizona e México. No deserto de Sonora, a jojoba cresce entre elevações de 600 a 1 200 metros, sendo que na Baja Califórnia e em algumas localidades do Estado de Sonora ela ocorre ao nível do mar. Sua grande dominância se verifica em áreas onde a precipitação pluviométrica é de 400 a 450 mm anualmente. Em seu habitat natural, leituras de 43 a 46°C são usuais durante o verão e plantas já adultas toleram baixas temperaturas como 10°C abaixo de zero. Trata-se de uma planta bastante resistente à seca e que cresce bem em condições de solo e umidade não favoráveis a outras culturas.

Muito pouco se sabia sobre a jojoba antes de GREENE e FOSTER⁽⁴⁾ terem determinado a composição química do óleo de suas sementes. Eles encontraram que a jojoba é a única planta conhecida, cujo óleo das sementes não é um triglicerídeo, mas uma mistura de dois ésteres monobásicos de duas cadeias longas de alcoóis, cada uma ligada com uma cadeia longa de ácidos graxos. Desde que a cera líquida das

sementes da jojoba apresenta certas características semelhantes ao óleo da baleia em sua composição química, viscosidade, gravidade específica e em outros testes de laboratório ela vem sendo utilizada como um de seus substitutos.

Até o momento, a jojoba é propagada apenas por sementes e este tipo de multiplicação resulta na produção de 50% de plantas masculinas e 50% de plantas femininas. Embora a jojoba possa, com certa dificuldade, ser propagada por estacas de caule, DAUGHERT & SINCATH⁽²⁾, este método não tem sido largamente utilizado. Isto sugeriu que outros métodos de propagação vegetativa deveriam ser estudados.

O recente progresso na cultura de células e tecidos *in vitro* tem fornecido bases para uma tecnologia que permita a aplicação de métodos microbiológicos a plantas superiores. O desenvolvimento desta tecnologia é importante para estudos básicos com vegetais, com aplicação prática na agricultura.

A cultura de tecidos e órgãos tem sido extensivamente empregada para produção de plantas completamente diferenciadas e, em geral, as plantas herbáceas têm sido mais facilmente propagadas do que plantas lenhosas. Entre as plantas lenhosas já multiplicadas por este método pode-se destacar espécies do gênero *Citrus* (CHATTUVERDI & MITRA, ¹), café, *coffea arabica* (HERMAN & HASS, ⁵) e maçã, *Malus Syventris* (DUTCHER & POWELL, ³).

A formação de uma planta, a partir de um simples tecido que normalmen-

* Trabalho extraído em parte da Dissertação de PhD do primeiro autor, apresentada ao Departamento de "Plant Sciences" da Universidade do Arizona, Tucson, Arizona, U.S.A.

** Professor do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

*** Professor do Departamento de "Plant Sciences" da Universidade do Arizona, Tucson, Arizona, U.S.A.

te não se diferencia, representa um considerável progresso, de grande valor na produção de plantas livres de patógenos, e na rápida obtenção de novos clones e cultivares.

O objetivo deste trabalho foi estudar a relação entre os reguladores do crescimento-ácido naftalenoacético (ANA) e 6—furfurilaminopurina (cinetina) — no crescimento e diferenciação de tecidos de jojoba *in vitro*, e determinar as melhores combinações desses reguladores na produção de órgãos, quando cultivados em um definido meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Como fontes de tecidos, foram utilizadas plantas de dois anos de idade, crescendo em jarros de plástico com capacidade para 10 litros, localizados em uma casa de vegetação, termosta-

ticamente controlada, do *campus* da Universidade do Arizona, USA. Cada "tecido" foi preparado com auxílio de um microscópio binocular e consistia da "cabeça" do meristema, envolvida pelo par de folhas primordiais mais jovens. Os tecidos foram esterilizados com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e polietileno sorbitan a 0,2%, durante 15 minutos. Utilizando-se uma câmara de transferência, os tecidos foram transplantados asépticamente para um meio de cultura modificado do original de MURASHIGE e SKOOG⁽⁹⁾ — Tabela 1. Foram adicionados ao meio de cultura os reguladores do crescimento isolados ou em combinações na forma de cinetina e ANA. As concentrações de cinetina foram 0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00 e 7,00 mg/l. Para o ANA as concentrações foram 0,00; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 3,00; 5,00; 10,00; 15,00 e 20,00 mg/l.

TABELA 1

Composição do Meio Nutritivo de Murashige e Skoog, Modificado, Utilizado no Crescimento e Diferenciação de Tecidos de Jojoba. Tucson, Arizona, U.S.A., 1976.

MACRO-ELEMENTOS		MICRO-ELEMENTOS	
	mg/l		mg/l
NH_4NO_3	1.650	H_3BO_3	6.2
KNO_3	1.900	MnSO_4	22.3
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	ZnSO_4	8.6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	KI	0.9
KH_2PO_4	170	NaN_2O_4	0.3
Na_2EDTA	37.3	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.03
FeSO_4	27.8	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.03
CONSTITUENTES ORGÂNICOS			
Sacarose	50 g/l	Agar	10 g/l
Edamina	1 g/l	Mio-Inositol	100 mg/l
Glicina	2 mg/l	Ácido Nicotínico	0,5 mg/l
Piridoxina	0,5 mg/l	Tiamina.HCl	0,1 mg/l
Polivinilpirolidone	5 g/l	Caseína Hidrolizada	1 g/l
Ácido Guanílico	100 mg/l	Ácido Citidílico	100 mg/l
L-Gluatamina	500 mg/l	L-Asparagina	500 mg/l

O meio foi ajustado para pH de 5,6 a 5,8, com adição de poucas gotas de HCl ou NaOH, antes de autoclavado e da adição de agar. Procedeu-se, a seguir, a sua distribuição em alíquotas de 25 ml, em tubos de cultura de 25x150 ml. A esterilização foi completada autoclavando-se os tubos com o meio nutritivo a uma pressão de 1 kg/cm², e temperatura de 120°C, durante 20 minutos.

Cada tratamento continha 10 replicações e cada tubo foi inoculado em condições assépticas com um tecido de jojoba. Os tubos inoculados foram colocados em uma câmara de crescimento, com 16/8 horas luz/escuro por dia. A intensidade da luz foi regulada para 200 vela/pé ao nível do tecido. A temperatura durante o dia foi regulada para 27°C e, à noite, para 23°C, com umidade relativa controlada ao nível de 75%.

Os tubos foram incubados durante 60 dias e, semanalmente, o crescimento e diferenciação dos tecidos foram observados e anotados. Todos os tubos contaminados foram substituídos no mais tardar uma semana após o aparecimento da contaminação. Após 60 dias os explantes (tecidos) foram removidos e pesados, contando-se os que se diferenciaram apenas em calo,

calo com raízes, calo com folhas e em calo com caules e folhas. Os dados foram estatisticamente estudados através da análise de variância e por regressão linear e quadrática.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Número de Explantes Vivos

Após 60 dias no meio de cultura, 81,60% dos explantes estavam vivos, indicando que a adição de cinetina e ANA isolados ou em combinações, afetaram o número de explantes vivos (Tabela 2). Cinetina e ANA foram fatores críticos na regulação do número de explantes vivos. O mais baixo número foi observado no tratamento sem adição desses reguladores do crescimento, ou na presença de 0,25 mg/l de ANA.

Pode-se também constatar que concentrações de ANA acima de 5,00 mg/l reduziram claramente o número de explantes vivos. Uma possível explicação para ação da alta concentração de ANA em reduzir o número de explantes vivos é que elevadas concentrações de auxina induzem a produção de etileno, com efeitos tóxicos para os tecidos.

Uma significativa observação foi que cinetina aplicada sozinha, em todos os

TABELA 2

Número de Tubos com Explantes Vivos após 60 Dias no Meio de Cultura com Diferentes Níveis de Cinetina e Ácido Naftalenoacético (1.000 Tubos, 100 Tratamentos, 10 Tubos por Tratamento e 1 Explante por Tubo). Tucson, Arizona, USA, 1976

Cinetina (mg/l)	ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO (mg/l)										Total
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	3,00	5,00	10,00	15,00	20,00	
0,00	4	4	6	7	9	8	6	6	6	5	61
0,25	8	9	8	9	8	8	8	8	8	7	81
0,50	10	8	8	8	8	8	9	7	8	8	82
1,00	9	8	9	9	9	8	9	9	8	6	84
2,00	10	10	10	10	9	9	10	10	8	7	93
3,00	9	10	10	10	9	9	9	8	8	6	88
4,00	10	10	10	9	9	8	9	7	8	7	87
5,00	10	9	8	9	8	9	9	7	7	7	83
6,00	8	10	10	10	8	8	9	6	6	6	81
7,00	9	9	10	9	8	8	6	6	6	5	76
TOTAL	87	87	89	90	85	83	84	74	73	64	816

níveis, produziu um mais alto número de explantes vivos, comparada com o ANA aplicado separadamente. Adição de cinetina até 2,00 mg/l, mesmo em combinações com altas concentrações de ANA decresceu o número de explantes mortos. Isto sugere que o efeito inibitório do ANA em altos níveis foi superado pela ação da cinetina. RICHMOND e LANG⁽¹⁰⁾ reportaram que este decréscimo da senescência, pela ação da cinetina, está associada com a manutenção dos conteúdos de clorofila e proteína, ou pelo aumento de absorção e retenção de metabólitos de baixo peso molecular.

Peso Fresco dos Explantes

As médias de peso fresco dos explantes tratados com diferentes níveis de ANA e cinetina estão presentes na Tabela 3. A média mais baixa foi obtida no tratamento sem adição de cinetina e ANA, embora algum crescimento tenha sido observado. Tecidos tratados com ANA, isoladamente, em baixas concentrações, mostraram grande aumento em peso e alcançaram um peso fresco total maior que aqueles tratados com cinetina separadamente. O tratamento que resultou em mais baixo peso fresco foi sem adição de cinetina e ANA. O mais alto peso fresco foi obtido com explantes tratados com 3,00 mg/l de cinetina em combinação com 1,00 mg/l de ANA. Evidentemente, ambas, citocininas e auxinas foram requeridas para o rápido crescimento *in vitro* de explantes de jojoba. Isto também foi observado por LINSMAIER e SKOOG⁽⁷⁾, trabalhando com tecido de fumo *in vitro*.

A adição de cinetina e ANA, em combinações, apresentou uma interação com relação ao aumento de peso dos explantes. Provavelmente, esta interação ocorreu porque a cinetina trabalha primariamente como um fator de indução da divisão celular, enquanto o ANA atua como um fator de alongação celular. Assim, eles, em combinação com concentrações balanceadas, têm a capacidade de aumentar a massa de tecidos por divisão e alongação celu-

lar ao mesmo tempo, em mais baixas concentrações que quando aplicados isoladamente.

Testes estatísticos, baseados sobre o peso fresco médio dos explantes, mostraram diferenças significativas entre explantes tratados com diferentes níveis de cinetina, diferentes níveis de ANA e pela interação cinetina x ANA em diferentes níveis (Tabelas 4, 5, 6 e 7).

Diferenciação em Calo

O crescimento dos explantes sobre o meio nutritivo foi muito lento durante os primeiros 21 dias. A primeira diferenciação em calo e uma proliferação muito intensa de células sobre a superfície cortada do explante foi observada após os primeiros 21 dias de cultura. Aos 60 dias de cultura, 75,5% dos explantes apresentaram algum tipo de diferenciação. O grau de diferenciação foi dependente dos níveis de cinetina e ANA aplicados separadamente ou em combinação. O número de explantes diferenciados em calo é apresentado na Tabela 8.

Explantes não tratados com cinetina ou ANA, ou tratados com 0,25 mg/l de ANA não formaram calo. Os resultados demonstram claramente que cinetina e ANA aplicados separadamente ou em combinação, podem induzir a formação de calo em tecidos de jojoba cultivados *in vitro*, desde que a maioria dos tratamentos apresentaram diferenciação em calo. Isto está em concordância com os resultados obtidos por KARTHA *et al.*⁽⁶⁾, trabalhando com tecidos de *Brassica napus in vitro*.

Calos produzidos em meio com ANA em concentrações de 0,25 a 3,00 mg/l eram bastante tenros e quebradiços e, quando pequenas quantidades desses calos eram imersos em água, eles prontamente se fragmentaram em numerosas células ou em pequenos grupos de células. Frequentemente, nas mais altas concentrações de ANA, o calo tornou-se escuro e com áreas necróticas. Os calos eram compactos e firmes, com ligeiras manchas verdes, quando cultivados com cinetina ou cinetina em com-

TABELA 3

Peso Fresco Médio (mg) dos Explantes Vivos Após 60 Dias no Meio de Cultura com Diferentes Níveis de Cinetina e Ácido Naftalenoacético (1 080 Tubos, 100 Tratamentos, 10 Tubos por Tratamento, 1 Explante por Tubo). Tucson, Arizona, U.S.A., 1976.

Cinetina (mg/l)	ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO (mg/l)										Peso	
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	3,00	5,00	10,00	15,00	20,00	Médio	Médio
0,00	38,75	57,75	83,16	103,00	108,44	117,87	111,50	109,00	100,66	99,80	92,99	92,99
0,25	52,12	65,22	85,25	105,22	130,00	124,12	113,62	109,37	103,75	97,42	98,61	98,61
1,00	66,55	91,62	99,62	114,37	137,12	120,87	111,22	111,28	104,87	100,87	104,61	104,61
0,50	54,30	98,62	106,11	133,55	182,55	144,75	129,22	118,55	106,87	102,83	118,96	118,96
2,00	79,90	99,70	114,20	154,00	204,33	157,33	133,60	118,50	109,25	107,42	127,82	127,82
3,00	91,88	100,20	130,30	209,20	240,88	230,22	152,55	139,25	118,25	110,16	152,29	152,29
4,00	94,90	119,60	150,80	173,33	229,44	230,87	158,22	142,57	101,25	101,85	150,28	150,28
5,00	97,60	109,11	114,62	133,11	163,62	156,44	136,33	106,57	101,28	99,00	121,77	121,77
6,00	97,62	98,10	98,20	108,60	162,62	118,87	103,77	98,66	98,50	100,00	108,49	108,49
7,00	97,22	97,33	97,50	102,33	131,00	125,00	101,33	94,83	94,00	92,00	103,25	103,25
Peso Médio	77,08	93,72	107,98	133,67	169,00	152,63	125,13	114,86	103,87	101,13	117,90	117,90

TABELA 4

Análise da Variância do Logarítmo do Peso dos Explantos Vivos Tratados com Cinetina e Ácido Naftalenoacético Após 60 Dias no Meio de Cultura. Tucson, Arizona, U.S.A., 1976.

FONTE DE VARIAÇÃO	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Cinetina	9	2,143	85,155 **
Ácido Naftalenoacético	9	4,389	174,426 **
Cinetina x Ácido Naftalenoacético	81	0,152	6,043 **
Resíduo	716	0,025	
TOTAL	815	0,108	

** Significante ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 5

Coefficiente de Regressão Linear e Quadrática e de Determinação (R^2) para a Regressão do Logarítmo do Peso dos Explantos Vivos em Cada Nível de Cinetina Após 60 Dias no Meio de Cultura. Tucson, Arizona, U.S.A., 1976.

Níveis de Cinetina (mg/l)	COEFICIENTES DE REGRESSÃO		
	Linear	Quadrática	R^2
0,00	0,29495 **	-0,19708 **	0,20192
0,25	0,28173 **	-0,19396 **	0,22955
0,50	0,20476 **	-0,14699 **	0,13731
1,00	0,09874 n.s.	-0,12663 **	0,07994
2,00	0,05021 n.s.	-0,09679 **	0,06328
3,00	0,06871 n.s.	-0,16251 **	0,12585
4,00	0,02542 n.s.	-0,15995 **	0,21939
5,00	0,00983 n.s.	-0,08415 *	0,13694
6,00	-0,02522 n.s.	-0,01224 n.s.	0,03266
7,00	-0,01122 n.s.	-0,03855 n.s.	0,06950

* Significante ao nível de 5% de probabilidade

** Significante ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 6

Coefficiente de Regressão Linear e Quadrática e de Determinação (R^2) para a Regressão do Logarítmo do Peso dos Explantos Vivos em Cada Nível de Ácido Naftalenoacético Após 60 Dias no Meio de Cultura. Tucson, Arizona, USA, 1976.

Níveis de ANA (mg/l)	COEFICIENTES DE REGRESSÃO		
	Linear	Quadrática	R^2
0,00	0,32154 **	-0,19254 **	0,72472
0,25	0,16955 **	-0,17096 **	0,43606
0,50	0,10980 **	-0,20659 **	0,53318
0,75	0,08200 **	-0,30982 **	0,60459
1,00	0,13630 **	-0,32934 **	0,59391
3,00	0,10402 **	-0,29501 **	0,53016
5,00	0,03348 n.s.	-0,19290 **	0,37849
10,00	-0,00104 n.s.	-0,13779 **	0,27292
15,00	-0,01032 n.s.	-0,05830 *	0,07340
20,00	-0,00550 n.s.	-0,05629 *	0,14580

* Significante ao nível de 5% de probabilidade

** Significante ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 7

Coefficientes de Regressão Linear e Quadrática e de Determinação (R^2) para a Regressão do Logaritmo do Peso dos Explantes Vivos Tratados com Cinetina e Ácido Naftalenoacético Após 60 Dias no Meio de Cultura. Tucson, Arizona, U.S.A., 1976.

VARIÁVEIS	COEFICIENTES DE REGRESSÃO	
	Linear	Quadrática
Cinetina	0,08812 **	-0,19417 **
Ácido Naftalenoacético	0,09160 **	-0,12103 **
Cinetina x ANA	0,05388 **	
Coefficiente de Determinação	0,26056	

** Significante ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 8

Número de Tubos com Diferenciação em Calo, Após 60 Dias no Meio de Cultura com Diferentes Níveis de Cinetina e Ácido Naftalenoacético (1000 Tubos, 100 Tratamentos, 10 Tubos por Tratamento, 1 Explante por Tubo). Tucson, Arizona, U.S.A., 1976.

Cinetina (mg/l)	ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO (mg/l)										
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	3,00	5,00	10,00	15,00	20,00	Total
0,00	0	0	4	7	8	8	7	6	7	6	53
0,25	3	4	6	6	8	8	9	8	8	7	67
0,50	3	4	6	8	8	8	9	8	8	8	70
1,00	4	5	9	9	9	8	9	9	8	6	76
2,00	4	8	9	9	10	9	9	9	8	7	82
3,00	5	7	9	10	10	10	8	8	8	8	83
4,00	7	9	10	10	10	10	10	8	9	7	90
5,00	7	8	10	9	10	9	9	7	7	7	83
6,00	6	8	9	9	9	9	9	7	6	6	78
7,00	6	8	8	8	10	7	7	6	6	6	73
TOTAL	45	61	80	85	92	87	86	76	75	68	755

binção com ANA, em concentrações de 0,25 a 0,50 mg/l.

Resultados semelhantes foram obtidos por WINTON⁽¹³⁾, trabalhando com tecidos de *Aspen populus* sp, *in vitro*.

Diferenciação em Calo com Raízes

A primeira diferenciação em raiz apareceu na extremidade do calo após 30 dias de cultura. Após 60 dias, 4,9% dos explantes formaram raízes, contendo muitos pelos radiculares com coifas escuras. A maior extensão das raízes foi de aproximadamente 6 cm. O número de raízes por explante foi de

1 a 6 e, em certos casos, apresentaram geotropismo negativo. VASIL e HILDEBRANDT⁽¹²⁾ também encontraram explantes com formação de raízes, dotadas de geotropismo negativo, em experimento com *Petroselinum hortense*.

O aparecimento de raízes aumentou o peso fresco dos explantes dotados desses órgãos. Idênticos resultados foram obtidos por LOO⁽⁸⁾, trabalhando com tecidos de aspargo, *Asparagus asparagoides*, *in vitro*. O efeito das raízes em aumentar o crescimento do explante deve ser atribuído à produção por elas de um ou mais reguladores do crescimento, ou devido

ao aumento da capacidade dos explantes em retirar os nutrientes do meio.

Como se mostra na Tabela 9, a diferenciação de raízes dependeu da concentração de cinetina e ANA separadamente ou em combinação. Na ausência de ANA, nenhum dos níveis de cinetina induziu a formação de raízes, mas, quando o ANA foi aplicado sem a presença de cinetina, algumas raízes foram formadas nos tratamentos com 1,00; 3,00 e 5,00 mg/l. O número mais alto de explantes, apresentando diferenciação de calo com raízes, foi obtido quando os mesmos foram tratados com 1,00 mg/l de ANA. Acima dessa concentração, o ANA começou a inibir a formação de raízes. Em conclusão, a diferenciação de raízes pareceu ser uma função da atividade do ANA, desde que a cinetina sozinha não induziu o desenvolvimento de raízes. A hipótese de que a auxina tem um importante papel na formação de raízes foi comprovada, desde que o desenvolvimento destas foi induzido pelo ANA sozinho ou em combinação com cinetina.

Diferenciação em Calo com Folhas

As primeiras diferenciações em calo com folhas tornaram-se claramente visíveis em muitos dos explantes aos 21

dias de cultivo. A maioria desses organóides consistia de duas pequenas folhas verdes sobre o calo. Em 14,8% dos tubos cultivados se diferenciaram organóides, mas eles falharam na indução de raízes. O número de tubos com diferenciação em calo com folhas é apresentado na Tabela 10.

O ANA aplicado em todos os níveis sem a presença de cinetina não foi efetivo para induzir a diferenciação de folhas, e isto também ocorreu com respeito aos explantes não tratados com cinetina. Meristemas tratados com cinetina, mesmo na ausência do ANA, produziram folhas em todas as concentrações. Cinetina, em combinação com baixos níveis de ANA, determinou um maior número de tubos com diferenciação de calo com folhas do que quando aplicado isoladamente. O maior número de tubos com diferenciação em calo com folhas foi observado quando os explantes foram tratados com 3,00 mg/l de cinetina em combinação com 0,25 mg/l de ANA. Os resultados demonstraram que a formação de folhas em tecidos de jobba pode ser induzida *in vitro* e que a cinetina parece ser o fator específico para isto, como o ANA para a formação de raízes. Estas observações estão de acordo com os resultados obtidos por SKOOG⁽¹¹⁾.

TABELA 9

Número de Tubos com Diferenciação em Calo e Raízes, Após 60 Dias no Meio de Cultura com Diferentes Níveis de Cinetina e Ácido Naftalenoacético (1.000 Tubos, 100 Tratamentos, 10 Tubos por Tratamento e 1 Explante por Tubo) Tucson, Arizona, U.S.A., 1976.

Cinetina (mg/l)	ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO (mg/l)										
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	3,00	5,00	10,00	15,00	20,00	Total
0,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,25	2	1	1	1	1	1	—	2	—	—	9
0,50	2	2	2	1	1	1	2	—	—	—	11
1,00	2	1	2	2	2	2	1	1	1	—	14
2,00	2	3	2	4	2	5	—	—	1	—	19
3,00	3	4	3	3	3	3	4	1	—	1	25
4,00	3	3	4	2	2	2	2	1	1	1	21
5,00	2	3	3	2	1	1	2	1	1	—	16
6,00	2	3	1	2	3	2	—	2	1	1	17
7,00	1	2	2	2	2	1	2	1	1	2	16
TOTAL	19	22	20	19	17	18	13	9	6	5	148

TABELA 10

Número de Tubos com Diferenciação em Calo e Folhas, Após 60 Dias no Meio de Cultura com Diferentes Níveis de Cinetina e Ácido Naftaleno-acético. (1.000 Tubos, 100 Tratamentos, 10 Tubos por Tratamento e 1 Explante por Tubo). Tucson, Arizona, U.S.A., 1976.

Cinetina (mg/l)	ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO (mg/l)										Total
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	3,00	5,00	10,00	15,00	20,00	
0,00	—	—	—	—	2	1	1	—	—	—	4
0,25	—	—	—	1	—	1	2	—	—	1	5
0,50	—	—	—	—	2	1	—	1	—	—	4
1,00	—	—	—	2	1	1	—	1	1	—	6
2,00	—	—	—	1	2	1	1	—	—	—	5
3,00	—	—	—	3	2	1	1	1	—	—	8
4,00	—	—	—	2	—	1	—	1	1	—	5
5,00	—	—	—	—	2	—	—	—	—	2	4
6,00	—	—	—	3	1	—	1	1	1	—	7
7,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
TOTAL	—	—	—	12	12	7	6	5	3	4	49

Diferenciação em Calo com Caules e Folhas

Após 60 dias no meio de cultura somente 0,6% dos explantes desenvolveram calos com caules e folhas, bem diferenciados. Geralmente, apenas duas pequenas folhas verdes foram formadas sobre o topo do caule. O número de tubos com diferenciação em calo com caules e folhas é apresentado na Tabela 11.

Explantes sem a presença de cinetina ou ANA no meio de cultura não formaram esses organóides. O ANA aplicado isoladamente em diferentes concentrações não foi efetivo na indução de caules com folhas, mas quando a cinetina estava presente no meio nutritivo, em concentração de 2,00 mg/l, ou, mais elevada, houve alguma formação de tais organóides. Concentrações de ANA superiores a 0,75 mg/l, isoladamente ou em combinação com ci-

TABELA 11

Número de Tubos com Diferenciação em Calo, Com Caules e Folhas, Após 60 Dias no Meio de Cultura com Diferentes Níveis de Cinetina e Ácido Naftalenoacético. (1.000 Tubos, 100 Tratamentos, 10 Tubos por Tratamento e 1 Explante por Tubo). Tucson, Arizona, U.S.A., 1976.

Cinetina(mg/l)	ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO (mg/l)										Total
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	3,00	5,00	10,00	15,00	20,00	
0,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,50	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1
1,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,00	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
3,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4,00	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
5,00	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
6,00	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	2
7,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
TOTAL	3	1	1	1	—	—	—	—	—	—	6

netina, inibiram a formação de calo com caules e folhas. A diferenciação dos referidos organóides parece ser função da atividade da cinetina, desde que o ANA isoladamente não foi capaz de induzir sua formação. Os explantes que formaram calo com caules e folhas não produziram raízes sob qualquer dos tratamentos. Isto pode ser devido ao inadequado suprimento do meio nutritivo, às taxas de combinação cinetina/ANA, a mudanças na constituição genética dos explantes ou ao pouco tempo de cultivo dos tecidos.

CONCLUSÕES

— Desde que os tecidos de jojoba inoculados no meio nutritivo, sem a presença de cinetina e ácido naftalenoacético, falharam quanto à proliferação de células, ou produção de calo, caules, folhas e raízes, parece que não há uma forte tendência desses tecidos para sofrer diferenciação;

— Pode-se admitir que os tratamentos utilizados induziram algumas mudanças nos explantes, resultando em algum tipo de diferenciação;

— O tipo de diferenciação obtido dependeu das concentrações dos reguladores do crescimento utilizados, isoladamente ou em combinação.

SUMMARY

Jojoba, *Simmondsia chinensis* (Link) Schneid, shoot tips containing the meristem dome surrounded by 1 pair of the youngest leaf primordia were excised and cultured aseptically for 60 days on modified Murashige and Skoog medium. Kinetin and naphthaleneacetic acid, alone or in combinations at 10 different levels, were added to the nutrient medium to determine the best combinations of these growth regulators to produce differentiated organs, when submitted to a defined medium.

The requirements for naphthaleneacetic acid and/or kinetin seemed to be specific and indispensable at adequate concentrations or in balanced ra-

tics, both for initiation of callus and for the development of roots, shoots and leaves. Statistical tests based on the average fresh weight of the explants showed highly significant differences between explants treated with different levels of naphthaleneacetic acid, different levels of kinetin and by the interaction of kinetin and naphthaleneacetic acid.

LITERATURA CITADA

1. CHATUVERDI, H.C. and C.C. MITRA. 1974. Clonal Propagation of Citrus from Somatic Callus Culture. Hort Sciences. 9 (2): 118-120.
2. DAUGHERTI, P.M. and H.H. SINCATH. 1953. A Survey of *Simmondsia chinensis* (Jojoba). Georgia Inst. of Tech. Eng. Exp. Station. Bul. 17.
3. DUTCHER, R.D. and L.E. POWELL. 1972. Culture of Apple Shoots from Buds *In Vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97 (4): 511-514.
4. GREENE, R.A. and E.O. FOSTER. 1933. The Liquid Seeds of *Simmondsia californica*. Botanical Gazette. 94 (4): 826-828.
5. HERMAN, E.B. and G.J. HASS. 1975. Clonal Propagation of *Coffea arabica* L. from Callus Culture. Hort. Sciences. 10 (6): 588-589.
6. KARTHA, K.K.; O.L. GAMBORG and F. CONSTABEL. 1974. *In Vitro* Plant Formation from Stem Explants of Rape, *Brassica napus* cv. Zephyr. Physiol. Plant. 31: 217-220.
7. LINSMAIER, E.M. and F. SKOOG. 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 18: 100-127.
8. LOO, S.W. 1945. Cultivation of Excised Stem Tips of Asparagus *In Vitro*. Amer. J. Bot. 32: 13-17.
9. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Biotassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
10. RICHMOND, A.E. and A. LANG. 1957. Effect of Kinetin on Protein Content and Survival of Detached Xanthium Leaves. Science. 125: 650-651.
11. SKOOG, F. 1950. Chemical Control of Growth and Organ Formation in Plant Tissues. Annee Biol. 26: 545-562.
12. VASIL, I.K. and A.C. HILDEBRANDT. 1966. Variations of Morphogenic Behavior in Plant Tissue Culture II. *Petroselinum hortense*. Amer. J. Bot. 53 (9): 869-874.
13. WINTON, L.L. 1970. Shoot and Tree Production from Aspen Tissue Cultures Amer. J. Bot. 57 (8): 904-909.