Gregori da Encarnação Ferrão

Engenheiro Agrônomo

**Concentração de potássio em meio de cultura e em explantes de cenoura (*Daucus carota* L.) e
diferenciação celular *in vitro***

Orientador:

Prof. Dr. MURILO DE MELO

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas**

Piracicaba

2006

ERRATA

Ferrão, E. F. **Concentração de potássio em meio de cultura e em explantes de cenoura (*Daucus carota* L.) e diferenciação celular *in vitro***. Piracicaba, 2006. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Página Onde se Lê Leia-se
44 Figura 4A

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Ferrão, Gregori da Encarnação

Concentração de potássio em meio de cultura e em explantes de cenoura (*Daucus carota* L.) e diferenciação celular *in vitro* / Gregori da Encarnação Ferrão. - - Piracicaba, 2006.

71 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Cenoura 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Fertirrigação "in vitro" 4. Morfogênese vegetal 5. Nutrição vegetal 6. Potássio 7. Propagação vegetal I. Título

CDD 635.13

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais Marlene e Ferrão exemplos em minha caminhada. Símbolos que me espelho e luto para me tornar um dia. E minha irmã sempre junto de meu coração.

Penso que só podemos ver nossos sonhos se realizando, quando estes se realizam com quem amamos.

Pai, obrigado pela força, determinação e perseverança

Mãe, obrigado por tudo!

À vocês ofereço nossas conquistas.

À Sídia de Mari por todo apoio e incentivo de continuar meus estudos
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram:

Ao Prof. Dr. Murilo de Melo pelos ensinamentos e amizade e paciência.

Ao Mineiro Rogério.

Ao grande amigo Amaral.

Às amigas Lillian Pino e Flávia Cavalini pela sobriedade e ajuda sempre.

Aos colegas do CEBTEC, em especial à Valesca Pandolfi, Carlos Francisco Ragassi, Roberta e Camila

Plantões tira-dúvidas e descontração dos grandes amigos Jales e Lúcio

Aos companheiros de trabalho e festa: Henrique, Adriano, André

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gallo.

À Profa. Dra. Helaine Carrer, do Departamento de Ciências Biológicas pelo apoio e amizade.

À Profa. Dra. Sônia Maria de Sthephano Piedade.

À todos os amigos do Curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

À Solizete exemplo de eficiência, trabalho e amizade

Ao pessoal do Cena, nesta nova caminhada que inicio

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 A cenoura.....	13
2.2 Cultura de tecidos e células de plantas.....	16
2.2.1 Calogênese.....	17
2.2.2 Morfogênese.....	18
2.2.3 Fatores que afetam a morfogênese.....	19
2.2.3.1 Genótipo.....	19
2.2.3.2 Meio de cultura.....	19
2.2.3.3 Condições ambientais.....	20
2.2.3.4 Tipo de explante.....	21
2.2.3.5 Manejo das plantas matrizes.....	22
2.3 Essencialidade dos nutrientes.....	23
2.3.1 Potássio nas plantas.....	25
2.3.1.1 Principais funções do potássio.....	25
2.4 Fosfoenolpiruvato Carboxilase (PEPC).....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Obtenção de plantas matrizes.....	30
3.2 Tratamento com as soluções nutritivas.....	30
3.3 Estabelecimento da cultura de calos.....	32

3.3.1 Assepsia dos explantes	32
3.3.2 Calogênese.....	32
3.4 Diferenciação celular.....	35
3.5 Atividade da enzima PEPCarboxilase.....	36
3.6 Extração protéica.....	36
3.7 Delineamento estatístico e análise estatística.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Desenvolvimento das plantas matrizes.....	38
4.2 Calogênese.....	39
4.3 Diferenciação celular.....	47
4.4 Concentração de proteínas.....	53
4.5 Atividade da PEPC.....	56
5 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	60

RESUMO

Concentração de potássio em meio de cultura e em explantes de cenoura (*Daucus carota* L.) e diferenciação celular *in vitro*

Visando compreender como o potássio (K^{+1}) afeta o comportamento de explantes em cultura de tecidos, dois aspectos relacionados com o suprimento de K^{+1} , utilizando plantas matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.), foram investigados neste trabalho. Em primeiro lugar, as matrizes das quais foram extraídos os explantes foram tratados por durante 60 dias com solução nutritiva contendo níveis limitantes e excessivos, comparados com o nível ideal de potássio, para o crescimento vegetal. Em segundo lugar explantes extraídos das matrizes de cenoura tratadas foram cultivadas em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962), contendo variáveis níveis de potássio para testar se, as insuficiências de K^{+1} dos explantes inoculados, podem ser corrigidos pelo potássio fornecido no meio de cultura. A variação na indução de calogênese e na diferenciação celular na forma de embriogênese somática foram avaliados. O K^{+1} como nutriente nos explantes e no meio de cultura afeta a calogênese linearmente até concentrações de potássio correspondentes a duas vezes a concentração presente na solução nutritiva de Sarruge e no meio de cultura de Murashige e Skoog. O efeito foi dependente da duração do tratamento com solução nutritiva. Explantes extraídos de matrizes tratadas por 60 dias, além de produzir maior massa de calos, também apresentam maior resposta ao aumento nos níveis de K^{+1} na solução nutritiva e no meio de cultura.

Os resultados para diferenciação celular, com base no número de plantas regeneradas por explante, não apresentou um padrão de resposta conclusivo. Entretanto pode ser observado tendência de maior regeneração de plantas, tanto nas células de calos induzidas em baixas concentrações, como nas altas concentrações de K^{+1} nas soluções nutritivas como nos meios de cultura utilizados nos tratamentos. Entretanto a análise de diferenciação, na forma de taxa de diferenciação celular (número de plantas regeneradas/massa seca ou fresca de calos) evidencia a ocorrência de maiores taxas de regeneração de plantas para tratamentos contendo tanto baixas como altas concentrações de K^{+1} na solução nutritiva e no meio de cultura, principalmente nos tratamentos de 60 dias de duração, exceto o tratamento com $\frac{1}{4}$ X de K^{+1} da solução nutritiva. A análise da diferenciação celular por este critério evidencia que células de calos induzidos em explantes tratados com baixos níveis de K^{+1} (menor calogênese) são mais morfogênicos do que aqueles induzidos com altos níveis de K^{+1} .

A análise da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) foi proposta neste trabalho como uma maneira de explicar como os carbonos e a energia contida no fosfoenolpiruvato (PEP), formado durante a glicólise, são transferidos para o ciclo de Krebs, para geração de energia e esqueletos carbônicos que suportam o crescimento e diferenciação celular, sabendo que, a piruvato quinase (PK) que converte o PEP a piruvato é inativada em baixas concentrações de K^{+1} . A atividade da PEPC foi inversamente proporcional com a concentração de K^{+1} na solução nutritiva usada no tratamento das plantas matrizes, principalmente no tratamentos de 60 dias de duração. A variação dos níveis de K^{+1} no meio de cultura não afetou conclusivamente a atividade da PEPC.

Palavras-chave: Nutrição vegetal, calogênese, diferenciação celular, cultura de tecidos, fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC).

ABSTRACT

Treatment of matrixes plants and explants in carrot (*Daucus carrot* L.) with K^{+1} and *in vitro* Somatic Embryogenesis.

In order to have an insight on how potassium nutrition affects plant tissue culture, two aspects of the subject were investigated in this work. Firstly, the potassium nutrition in the used explants was tested by treating carrot plant matrixes with nutritive solutions containing limiting and excessive potassium levels compared to that supposed to proportionate ideal plant growth. Secondly, explants from carrot treated matrix plants were cultivated in tissue culture media, also containing variable potassium concentration, to test whether or not eventual potassium deficiency in the used explants may be repaired by potassium present in the culture media. The variation on the induced callogenesis and cell differentiation, as somatic embryogenesis, on the treated explants were evaluated. Potassium as nutrient in the explants and in the culture media affects callogenesis induction linearly up to concentrations corresponding to twice of that present in Hoagland's nutritive solution and in Murashige and Skoog's culture medium. The effect was dependent on the treatment duration with nutritive solution. Explants from carrot matrix plants treated for sixty days; besides producing more callus cells they showed a more pronounced response to potassium treatment with both nutritive solution and culture medium. The results for cell differentiation did not show a very well defined pattern, however a tendency of plant regeneration to be related to low and high potassium concentration in both, nutritive solution and culture media, treatments could be observed. By analyzing cell differentiation as differentiation ratio (number of regenerated/ fresh or dry matter of callus) it becomes clearly, mainly for the 60 days treatments duration, for both type of potassium treatments, high differentiation ratios occurred for treatments containing either low or high potassium concentration, excepting the treatment of matrix plants with $\frac{1}{4}$ of the potassium content in Hoagland's nutritive solution. By looking at cell differentiation through this approach it also becomes apparent that callus cells induced in treatments containing low potassium levels (lower callogenesis) are more morphogenesis than cells present in treatments containing high potassium concentration.

The assay of PEP carboxylase was proposed in this work as a way to explain how the carbons and energy in PEP formed in glycolysis would be transferred to Krebs to support cell growth and cell differentiation, knowing that activity of pyruvate kynase is impaired under K^{+1} deficiency. The PEP carboxylase activity was inverse related to concentration of potassium in the nutritive solution, mainly for the 60 days treatments. Variation of K^{+1} concentration in the culture media did not affect, conclusively, the PEP carboxylase activity.

Key words: plant nutrition, callogenesis, cell differentiation, tissue culture, PEP carboxylase (PEPC).

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos trabalhos com cultura de tecidos utilizam o meio de cultura estabelecido por Murashige e Skoog (MS) em 1962, o qual foi designado para cultura *in vitro* de *Nicotiana*. A otimização do meio de cultura existe somente quando as informações na literatura já não resultam em um padrão de resposta satisfatória no crescimento e diferenciação celular. A capacidade de regenerar plantas a partir de células é a base para o sucesso de qualquer programa de biotecnologia vegetal. Neste sentido, modificações no meio MS padrão têm sido relatadas na literatura como forma de maximizar respostas de calogênese e/ou regeneração *in vitro* em diversas culturas, por exemplo: trigo (PURNHAUSER; GYULIA, 1993), arroz (De BLOCK et al., 1989), cenoura (ROUSTAN et al., 1989), cevada (CHAUHAN; KOTHARI, 2004), aveia (HAO et al., 2006) e diversas outras plantas conforme revisado por Ramage e Willians (2002). Adaptações no meio MS também são comuns quando se busca otimizar a frequência e qualidade morfológica dos embriões somáticos (PHILLIPS, 2004). Tratamentos típicos, utilizados desde o início dos trabalhos com cultura de tecidos incluem o uso de reguladores de crescimento vegetal (qualitativa e quantitativamente), escolha do explante, composição do meio de cultura, forma física do meio (sólido, semi-líquido), pH, qualidade e quantidade de luz, temperatura, trocas gasosas e potencial osmótico (THORPE, 2000). Pesquisas mais recentes, centram seus objetivos na resposta celular sob a influência de tratamentos não ortodoxos como o fornecimento de micronutrientes (PURNHAUSER; GYULIA, 1993; MASHAYEKHI; NEUMANN, 2006), cálcio e boro (PULLMAN et al., 2003), ácido salicílico e extratos de calos (HAO et al., 2006) e a interação de diversos fatores (SMITH et al., 1997) sobre a indução de calogênese e/ou embriogênese somática.

O efeito que a planta matriz doadora de explantes, gera no comportamento destes *in vitro* é quase sempre relatado como sub-produto das pesquisas. O efeito resultante de variações genótípicas, ambientais e estresses de caráter biológico ou nutricional nas respostas do explante *in vitro* raramente são especuladas. Estes fatores certamente estão associados a variações na composição química do explante. A resposta que estas variações possam gerar no posterior cultivo *in vitro* é ainda incerta. Este fato evidencia que, importantes alternativas a serem utilizadas para otimizar as respostas do explante, são praticamente desconhecidas.

É interessante lembrar aqui a afirmação de Edmont B. Wilson em 1925 (citado por ALBERTS et al. 1983) de que há muito tempo tem se tomado evidente que a solução para qualquer problema biológico pode ser encontrado nas células de cada ser vivo. Células individualizadas de plantas, quase

sempre a ferramenta de trabalho do biólogo molecular, podem ser obtidas a partir de tecidos vegetais, comumente folhas, por processos de hidrólise utilizando enzimas ou através da indução de calogênese, uma das respostas mais comuns induzidas em tecido vegetal cultivado *in vitro*. A calogênese, as suspensões celulares e a cultura de protoplastos são de grande importância nos estudos biotecnológicos *in vitro* tais como: seleção de linhagens de células mutantes, expressão gênica, hibridação somática, reações metabólicas, produção de metabólitos de valor comercial. Portanto a otimização e maximização da calogênese, gerando células morfogênicas e/ou não morfogênicas é um pré-requisito para o sucesso dos programas de biotecnologia vegetal.

O desbalanço de nutrientes minerais afeta a atividade enzimática e consequentemente o metabolismo e o desenvolvimento vegetal. A fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) é uma enzima encontrada em plantas superiores, particularmente plantas C_4 , algas verdes e algumas bactérias. Sua função é catalisar a β -carboxilação do fosfoenolpiruvato (PEP) na presença de ácido carbônico (HCO_3^-) e Mg^{+2} , produzindo oxaloacetato (AOA) e fósforo inorgânico (Pi). Quando existe deficiência relacionada à baixa disponibilidade de fósforo, Moraes e Plaxton (2000), relatam um aumento de até 250% na atividade desta enzima de suspensões celulares de *Brassica napus*. Potássio (K^{+1}) e magnésio (Mg^{+2}) têm efeito sobre a atividade da enzima PEPC e das enzimas da glicólise, principalmente quinase pirúvica e fosfofrutoquinase. Na maioria dos tecidos não fotossintéticos de plantas C_4 e folhas de plantas C_3 a PEPC funciona como a principal enzima anaplerótica, desempenhando função chave no metabolismo do carbono e nitrogênio (NIMMO, 2003). Em situações de baixa disponibilidade de K^{+1} , a enzima piruvato quinase (PK) apresenta redução de sua atividade. Neste caso, o PEP formado na glicólise sob ação da PEPC converte-se em AOA, representando uma rota alternativa ("Bypass metabólico") para a produção de esqueletos carbônicos necessários fundamentalmente no metabolismo de nitrogênio. Porém ainda é pouco conhecido e controverso até que ponto essa rota alternativa pode atuar compensando a diminuição de atividade da PK sob condições de deficiência de K^{+1} .

Em 1952, Richards e Coleman averiguaram que a influência da disponibilidade de K^{+1} também está relacionada à síntese de poliaminas (PA), e a deficiência deste elemento é caracterizada pelo aumento das concentrações da putrescina. Isto se deve a função dominante do K^{+1} em manter o pH elevado e ao desbalanço de ânions no citoplasma. Na deficiência deste nutriente existe síntese de PA como forma de manter a homeostase do citossol. Essa concentração de poliaminas (principalmente putrescina) corresponde a até 30% do déficit de K^{+1} (Murty, 1971). Como a concentração de PA está relacionada ao

crescimento e desenvolvimento é natural que fatores que afetem sua síntese influenciem diretamente na organogênese e embriogênese somática.

Apesar do grande conhecimento gerado nas últimas décadas sobre a cultura de células e tecidos vegetais, e, os recentes avanços no entendimento da forma como certos fatores atuam influenciando a calogênese embriogênese somática e atividade enzimática, algumas lacunas ainda permanecem.

O objetivo do presente trabalho foi determinar o grau de influência do nível nutricional de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação, suplementadas com diferentes concentrações de K^{+1} sobre a calogênese, embriogênese somática e atividade da PEPC *in vitro*. A interação entre o estado nutricional dos explantes inoculados e a concentração de K^{+1} foram testadas com o objetivo de determinar quais tratamentos possibilitam otimizar as respostas calogênica e morfogênica. Procurou-se também monitorar as propriedades regulatórias que modulam o fluxo glicolítico dependente da concentração de K^{+1} , o qual determina o destino do PEP, induzidas por condições nutricionais aplicadas às plantas matrizes (*ex vitro*) e explantes (*in vitro*), avaliando-se a atividade da PEPC de calos originados nos diferentes tratamentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Cenoura

A cenoura (*Daucus carota* L.) pertencente à família das Apiáceas, tem sua origem no Oeste da Ásia, provavelmente Afeganistão e região do Mediterrâneo. Apresenta folhas compostas por folíolos finamente recortados com pecíolo longo e afilado, possuindo um tufo de folhas em posição vertical que pode atingir 50 cm de altura (FILGUEIRA, 2000). É uma planta bienal que emite o pendão floral após um adequado período de frio (períodos de baixa temperatura induzem o florescimento prematuro). O ciclo desta cultura gira em torno de 85-120 dias (os sinais do amadurecimento são amarelecimento e secamento das folhas inferiores), com tamanho final desejável de 16-22 cm de comprimento (FILGUEIRA, 2000). As produtividades médias no Brasil giram em torno das 40 toneladas por hectare (ton./ha). A maior produção do país, hoje, está concentrada na região sudeste, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor nacional com uma área de 10 mil hectares, seguido pelo Estado de Minas Gerais com 7 mil hectares cultivados (MINAS GERAIS, 2006). No ano de 2004, a companhia de entrepostos e armazéns gerais de São Paulo (CEAGESP) movimentou 81291 toneladas ao preço médio de 95 centavos por quilo (AGRIANUAL, 2006). Dados da Secretaria do Comércio Exterior (2006) apontam como as exportações brasileiras desta cultura são inexpressivas. Somadas as comercializações referentes aos anos de 2003 e 2004, o resultado é um volume aproximando-se das 21 toneladas, totalizando um rendimento médio de 19 mil dólares. A variação característica na produção reflete uma sazonalidade nos preços bem característica, onde o valor mínimo praticado no mês de julho precede o valor máximo de comercialização que ocorre no mês de agosto (AGRIANUAL, 2006).

Mesmo tendo seu primeiro uso com propósitos medicinais (SHANNON; GRIEVE, 1998), seu uso como planta alimentícia data de épocas remotas (ERICKSON, 1960). Os primeiros estudos com objetivos de se obter plantas melhoradas foram feitos a cerca de 150 anos atrás pelo pesquisador francês Vilmorin (ERICKSON, 1960), sendo que, muitas variedades desenvolvidas por ele foram utilizadas comercialmente até poucas décadas atrás.

Segundo Figueira (2000), as cultivares mais amplamente cultivadas no País pertencem a 2 grupos. O primeiro grupo engloba as cultivares Nantes, francesa, forto, holandesa, sendo que estas produzem cenouras cilíndricas de ótimo aspecto e sabor. Seu desenvolvimento é melhor em regiões de clima ameno apresentando intolerância a altas temperaturas. O segundo grupo engloba as plantas

selecionadas para semeadura na primavera e tem como principais cultivares comerciais as variedades Brasília, Primavera, Kuronan e Kuroda. Suas principais características são os melhores rendimentos e resistência à queima das folhas pelo calor, são muito tolerantes a altas pluviosidades, e não podem ser expostas a baixas temperaturas pois florescem facilmente. A cultivar Brasília mostra uma maior tendência a apresentar a parte superior da raiz esverdeada quando de sua exposição ao sol (FERREIRA, 1991).

Os fatores que levaram a cenoura a ter um crescimento em sua produção desde 1960 (AMMIRATO, 1983) estão baseados em suas propriedades nutricionais e também na reeducação alimentar da população mundial, sempre em busca de alimentos mais saudáveis e com benefícios na saúde. É importante salientar que no período 1990-2002 a produção brasileira teve crescimento de 160% (CAMARGO FILHO et al., 2005). A qualidade da proteína presente na cenoura, representada pela alta quantidade de aminoácidos essenciais (Tabela 1), consideráveis quantidades de vitamina B, um óleo essencial rico em vitamina E, e fonte rica de carboidratos também influenciam no aumento do consumo *per capita* em nível nacional e mundial (Tabela 2).

Tabela 1 - Composição de aminoácidos em um grama de proteína crua

Aminoácidos	Massa (em gramas)	Aminoácidos	Massa em gramas)
Triptofano	0.012	Valina	0.049
Treonina	0.042	Arginina	0.048
Isoleucina	0.045	Histidina	0.018
Leucina	0.048	Alanina	0.065
Lisina	0.044	Ácido aspártico	0.152
Metionina	0.008	Ácido glutâmico	0.224
Cistina	0.009	Glicine	0.033
Fenilalanina	0.035	Prolina	0.032
Tirosina	0.022	Serina	0.039

Fonte: ESTADOS UNIDOS (2006).

Tabela 2 - Valores nutricionais de cenoura consumida "in natura" (em 100 g)

Elemento	Concentração	Elemento	Concentração
Água	88.29 g	Vitaminas	
Energia	41 kcal	Ácido ascórbico (Total)	5.9 mg
Proteína	0.93 g	Tiamina	0.066 mg
Lipídeos (Totais)	0.24 g	Riboflavina	0.058 mg
Cinzas	0.97 g	Niacina	0.983 mg
Carboidratos	9.58 g	Ácido pantotênico	0.273 mg
Fibra (Total)	2.80 g	B	0.138 mg
Açúcares (Totais)	4.54 g	Folato (Total)	19 mcg
Sacarose	3.59 g	A	16811 UI
Glicose	0.59 g	E (alfa-tocoferol)	0.66 mg
Frutose	0.55 g	Tocoferol (beta)	0.01 mg
Minerais		K	13.2 mcg
Cálcio	33 mg	Lipídeos (Ácidos Graxos)	
Ferro	0.30 mg	Saturados	
Magnésio	12 mg	16:0	0,035 g
Fósforo	35 mg	18:0	0,002 g
Potássio	320 mg	Insaturados (mono)	
Sódio	69 mg	16:1	0,002 g
Zinco	0.24 mg	18:1	0,012 g
Cobre	0.045 mg	Insaturados (poli)	
Manganês	0.143 mg	18:2	0,115 g
Selênio	0.1 mcg	18:3	0,002 g

Fonte: ESTADOS UNIDOS (2006).

Para o cultivo, recomendam-se solos de textura areno-argilosa, ricos em matéria orgânica, de boa drenagem e sem pedregosidades (HAAG; MINAMI, 1981). Isto permite o desenvolvimento de cenouras de melhor qualidade (retas e lisas). Solos excessivamente argilosos ou arenosos devem ser evitados uma vez que dificultam a formação da raiz ou tem baixa capacidade de retenção de nutrientes e água, respectivamente. A cenoura é exigente em Boro, e quando em deficiência a raiz tuberosa apresenta rachaduras longitudinais (FILGUEIRA, 2000).

Hoje os centros de pesquisa estudam a macho esterilidade e os métodos para sua manipulação visando produzir uma semente F1 com fins comerciais (AMMIRATO, 1983). Porém, desde os anos 60, experimentos conduzidos demonstram o efeito da heterozigose na produção de híbridos F1 muito vigorosos. No entanto, até aquele momento não haviam sido desenvolvidos métodos satisfatórios para a produção de sementes híbridas.

Figura 1 – Esquema demonstrando a influência da heterozigose sobre a produtividade da cenoura

Além desse fator, as sementes de cenoura apresentam uma baixa taxa de germinação quando alguma das seguintes causas for constatada nas sementes: ausência de embrião ou embriões rudimentares, amplas variações de temperatura e excesso ou falta de água no substrato na fase de floração e enchimento do grão. Estes aspectos justificariam um maior estudo nos fatores que afetam o desenvolvimento *in vitro* dessas plantas, haja visto, esta ser uma prática que possibilitaria a produção de grandes quantidades de clones previamente selecionados e até com finalidades comerciais.

2.2 Cultura de tecidos e células de plantas

A cultura de tecidos vegetais apresenta certos aspectos que determinam vantagens de seu uso em estudos sobre as plantas *in vivo*. Espaço limitado, baixa radiação, alta umidade no interior dos frascos e trocas gasosas ineficientes são algumas características peculiaridades deste sistema de cultivo (SKREBSKY, 2003), resultando em plantas com anatomia, morfologia e fisiologia diferente daquelas cultivadas em casa de vegetação ou a campo (SARTORI, 2000).

O uso destas técnicas possibilita determinar as necessidades e exigências de cada espécie vegetal. O resultado é a aplicação de técnicas específicas com diferentes finalidades nas áreas de melhoramento genético, farmacologia, preservação de germoplasma e biologia molecular. Para Russowski (2001), algumas vantagens que esse sistema apresenta:

- Adaptação à demanda de mercado, já que o fluxo é contínuo;

- Exclui sazonalidade, distribuição geográfica e interferência do clima nas plantas alvo devido às condições de cultivo *in vitro* serem altamente controladas;
- Reduz o extrativismo de espécies de interesse e sua erosão genética;
- Espaço físico reduzido na produção;
- Exclui ação de animais e doenças.

A conservação das plantas *in vitro* se baseia no cultivo de plantas em laboratório, a partir de culturas de tecidos (GEORGE, 1993). A manutenção dos recursos fitogenéticos se utiliza de mudanças no ambiente de cultivo para desacelerar (crescimento lento) ou mesmo suprimir (criopreservação) o crescimento das células e tecidos (ROCA et al., 1991). O método do “crescimento lento” objetiva reduzir o metabolismo das plantas (LEMOS et al., 2002) e a criopreservação visa suprimir completamente o crescimento, armazenando-se as células ou tecidos vegetais em temperaturas ultra-baixas, usualmente em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2004). As vantagens de conservar o material genético nestas coleções sobre aqueles mantidos a campo são: redução de mão de obra, espaços reduzidos e acesso imediato ao germoplasma da coleção (ROCA et al., 1991).

O fenômeno que possibilita armazenar o material genético nessas coleções, e permitir pronta disponibilidade sempre que necessário, é conhecido como “totipotência”. Os tecidos vegetais possuem uma característica única, na qual uma única célula pode originar uma planta completa.

2.2.1 Calogênese

O calo é caracterizado por ser uma massa de células não diferenciadas, de proliferação contínua e desorganizada. As células do calo também podem iniciar uma diferenciação formando gemas que evoluem para eixos caulinares no processo caracterizado como totipotência. Para promover a indução de calos, uma das técnicas mais utilizadas é a adição de fitorreguladores ao meio de cultura, principalmente auxinas (XU; BEWLEY, 1992), o posterior cultivo em meio sem este fitorregulador possibilita que as células que constituem o calo formem embriões somáticos (MURASHIGE; NAKANO, 1965). Outras metodologias buscam otimizar a nutrição mineral e substituir, ao menos parcialmente, a adição de reguladores de crescimento na indução do processo de calogênese (PODDAR et al., 1997; KUMAR et al., 2001).

A cultura de células serve como excelente modelo experimental para estudos metabólicos (BHATNAGAR et al., 2002). Sua população homogênea de células em contato direto com o meio permite

examinar a influência dos tratamentos no metabolismo vegetal (MORAES; PLAXTON, 2000). A ausência de fatores exógenos não controlados e transporte intercelular, converge em maior exatidão de respostas celulares aos tratamentos aplicados (BHATNAGAR et al., 2002). Além da importância em estudos nutricionais, fisiológicos e bioquímicos a cultura de células ainda apresenta aplicabilidade na cultura de protoplastos utilizados para transformação de plantas sendo importante ferramenta do biólogo molecular, produção de metabólitos secundários de interesse comercial (principalmente substâncias medicinais)

2.2.2 Morfogênese

A morfogênese é fundamentalmente o resultado do processo de divisão e diferenciação celular organizadas, com padrões definidos, e que dependem basicamente, da atividade e expressão de certos genes. Assim fatores que controlam ou afetam esses eventos são responsáveis pela morfogênese. Tais fatores são variados e interagem de diversas formas, sendo quase impossível caracterizar um único fator específico para cada fenômeno morfogênico. Os efeitos isolados ou sinérgicos desses fatores variam de acordo com as condições de cada tipo de célula, que podem ser mais ou menos definidos de acordo com o tecido, órgão, espécie, variedade ou cultivar e peculiar para dada condição fisiológica do momento (HANDRO; FLOH, 1990).

Segundo Thorpe (2000) a embriogênese somática pode ser o melhor exemplo de totipotência constatada em um grande número de espécies. Outra via morfogênica que pode culminar na formação de uma planta é conhecida como organogênese. A via organogênica inicia pela formação de um meristema apical e é seguida pela organogênese radicular (PHILLIPS, 2004). As vias embriogênica ou organogênica podem ocorrer diretamente, sem a formação de um estágio intermediário conhecido como calo, ou indiretamente formando um calo e sendo denominada de “de novo” (GAMBORG; PHILLIPS, 1995). Algumas espécies podem regenerar por ambas as vias, mas a maioria apresenta regeneração através de uma ou de outra (PHILLIPS, 2004).

A frequência e qualidade morfológica dos embriões somáticos diferenciados *in vitro* pode ser manipulada através de diferentes tratamentos aplicados ao meio e forma de cultivo. Os principais fatores utilizados como tratamento visando alterar as respostas morfogenéticas, se concentram no fornecimento de fitorreguladores (fontes e concentrações), composição de nutrientes presente no meio, pH, luz (qualidade e quantidade), temperatura, composição de gases dissolvidos na atmosfera do recipiente e potencial

osmótico (PHILLIPS, 2004). Muitos desses fatores tem sido ajustados ou completamente alterados para as diferentes espécies como forma de permitir a maturação dos embriões (THORPE, 2000).

2.2.3 Fatores que afetam a morfogênese

Os principais fatores que atuam sobre a morfogênese podem ser divididos em: genótipo, substrato, ambiente e fatores do explante.

2.2.3.1 Genótipo

O uso de plantas geneticamente idênticas é uma técnica atrativa por subtrair o efeito da variabilidade genética (das culturas de polinização aberta) que influenciam na resposta morfogenética do cultivo *in vitro*. Grattapaglia e Machado (1998), já chamavam atenção ao fato de que mesmo cultivares diferentes de uma mesma espécie podem responder de forma ímpar aos tratamentos aplicados no cultivo de seus tecidos. Nakano et al. (2004) trabalharam em diversas espécies de um mesmo gênero (*Tricyrtis*), obtendo diferenças de até 10 vezes na formação de embriões somáticos, após transferência para meio sem regulador. A análise de mutantes de *Arabidopsis* com desenvolvimento anormal durante a embriogênese possibilitou determinar a influência do gene sobre o estabelecimento dos tecidos durante o processo embriogênico (TAIZ; ZEIGER, 2002). Por exemplo, a mutação no gene GNOM resulta em plantas sem a formação de raízes ou cotilédones (MAYER et al., 1993), de forma similar plantas mutantes no gene SHOOTMERISTEMLESS não formam o meristema apical da parte aérea (LINCOLN et al., 1994), ficando claro que o processo embriogênico requer expressão gênica específica e coordenada (TAIZ; ZEIGER, 2004), dependente do conteúdo genético que cada célula traz consigo.

2.2.3.2 Meio de cultura

A indução da morfogênese em tecidos cultivados *in vitro* é feito através da introdução exógena de estímulos químicos, nutrientes e de substratos diversos. A retirada de segmentos de tecidos de um organismo íntegro e sua transferência para o meio de cultura contendo nutrientes e reguladores de crescimento apropriados, traz como consequência a liberação de suas células do controle a que estavam submetidas esse organismo, expondo-as a uma condição alterada, permite que o potencial de divisão

celular possa expressar-se de novas formas, podendo levar a formação de novas estruturas organizadas, num processo morfogenético que ocorre *de novo* (HANDRO ; FLOH, 1990).

Um dos meios de cultura mais utilizado atualmente é aquele estabelecido por Murashige e Skoog em 1962. As variações existentes buscam adaptar este meio para o cultivo de diferentes espécies.

A sincronia no processo de embriogênese somática se faz extremamente necessário uma vez que em estudos de eventos moleculares e bioquímicos, essa assincronia pode mascarar os resultados (KOMAMINE et al., 2005).

Nos estudos em células cenoura de elementos como: fitormônios (MICHALCZUK et al., 1992), nitrogênio (AMMIRATO, 1983), concentrações de oxigênio (SHIMAZU; KURATA, 1999), potássio (AMARAL, 2003), boro (MASHAYEKHI; NEUMANN, 2006) foram fornecidos como tratamentos de modo a estabelecer qual tratamento apresenta padrões mais satisfatórios de resposta.

2.2.3.3 Condições ambientais

Os fatores físicos principais que podem exercer efeito sobre as culturas e interferir nos processos morfogenéticos são: o estado físico do meio, temperatura e condição luminosa.

Para Moraes e Plaxton (2000) o sistema ideal para estudar as variações nutricionais no metabolismo é aquele que se utiliza de suspensões celulares, pois elas contêm uma população homogênea de células na qual todas estão em contato direto com os nutrientes do meio.

Variações na temperatura permitem variar o intervalo entre dois sub-cultivos (LEMOS et al., 2002). A criopreservação também possui aplicabilidade muito grande na otimização da frequência de embriogênese somática de alguns tecidos. Bercetche et al. (1990) atentou para o fato que calos embriogênicos de *Picea abies*, criopreservadas apresentavam uma diferenciação mais homogênea que os controles não criopreservadas. Esse comportamento seria justificado pela morte de tecidos não embriogênicos no congelamento, resultando dessa forma em uma população mais homogênea e com alto potencial embriogênico (ENGELMANN, 2004). A temperatura também pode ser utilizada na forma de pré-tratamentos com temperaturas baixas como forma de induzir calogênese (JAIN et al., 1996). Mas o estudo que melhor demonstra o efeito da temperatura sobre a indução de uma resposta celular é aquele feitos por Audran et al. (1994) no qual demonstrou que a morfogênese em híbridos de *Chichorium* ocorria em aos 35°C, o desenvolvimento de calos e brotos se dá entre 20 °C e 25 °C e na temperatura intermediária de 30 °C apresentou claramente a mudança de embriogênese para organogênese.

As condições luminosas do meio como intensidade, qualidade e duração afetam particularmente o processo fotossintético e processos mediados pelo fitocromo. A resposta mais freqüente dos tecidos e expostos à luz é a indução da diferenciação celular (YEN; YEN, 1999). Mas existem casos documentados na literatura que demonstram que suspensões celulares de *Zinia elegans* expostos a condições luminosas sofrem uma redução na freqüência de diferenciação celular.(BURGESS; LINSTEAD, 1984). Para muitas outras espécies a luz não é requerida para induzir o processo de diferenciação celular (BLEE et al., 2001; MÖLLER et al., 2003). Möller et al. (2006) trabalhando com *Pinus radiata* obteve um aumento de 25% na taxa de diferenciação, em relação às células mantidas no escuro, expondo-as ao fotoperíodo de 16 horas de luz. Este tratamento também reduziu de cinco para dois dias o período necessário para visualizar o início da diferenciação. Com relação à qualidade da luz, vários comprimentos de onda (luz branca, azul, vermelho e vermelho distante) são testados na tentativa de intensificar a calogênese ou diferenciação celular (MORINI et al., 2000).

2.2.3.4 Tipo do explante

Nos tecidos em cultura, o controle da morfogênese é feito através da introdução exógena de estímulos, nutrientes e substratos diversos. A retirada de um fragmento de tecidos de um organismo íntegro e sua colocação no meio de cultura que contém nutrientes e reguladores de crescimento resulta na liberação destas células do controle a que estavam submetidas nesse organismo, expondo-as a uma nova condição, onde a capacidade de divisão pode ser readquirida (desdiferenciação) e o genoma pode expressar-se de novas formas conduzindo-as a novos padrões de diferenciação. Esses eventos podem, de diversas maneiras, levar a formação de novas estruturas organizadas, num processo morfogenético.

Antes de qualquer análise das respostas dos tecidos cultivados *in vitro*, deve-se considerar algumas peculiaridades relativas à sua natureza: os explantes podem apresentar diferentes tipos de células e graus de diferenciação (por exemplo, fragmentos de folha, segmentos de caule), ou serem histologicamente mais homogêneos (meristemas e medula caulinar). Deve-se lembrar ainda, que mesmo em explantes mais homogêneos quanto a sua constituição histológica, tal homogeneidade pode ser aparente: a medula caulinar do fumo, mostra ao longo do caule, um gradiente de ploidia que se reflete nas respostas quando da cultura *in vitro* (MURASHIGE; NAKANO, 1965; FLOH & HANDRO, 1985).

2.2.3.5 Manejo da planta matriz

O verdadeiro desafio da cultura de tecidos está no material vegetal em si e na manipulação deste antes de se isolar o explante inicial (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Esta manipulação inclui o manejo da planta matriz, pois seu estado fisiológico, nutricional e fitossanitário tem grande influência no posterior comportamento dos explantes extraídos destas matrizes quando cultivados *in vitro*. Os mesmos autores afirmam que a capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associado não apenas ao genótipo, mas também às características fisiológicas da planta matriz, determinanda e controlada por diversos fatores endógenos. Plantas bem nutridas, sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica, em geral fornecem explantes que apresentam melhor desempenho *in vitro*. Bhojwani e Razdan (1983) destacaram que o estado fisiológico da planta matriz no momento da excisão do explante tem influência definitiva na resposta de crescimento, e que para minimizar as flutuações de respostas é recomendado manter as plantas parentais sob condições de casa de vegetação. A manutenção das plantas matrizes em casa de vegetação facilita não somente o controle e manipulação do fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura, mas também o controle do estado nutricional e fitossanitário das plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Existe uma grande variedade de estudos relacionados com a micropropagação da cenoura, no entanto, ocorre uma carência de trabalhos que relacionam a influência da origem da planta matriz no posterior processo de morfogênese *in vitro*. Esse aspecto foi pouco abordado nos estudos feitos com cenoura. Os trabalhos referentes à nutrição mineral em cultura de tecido vegetal se restringem às discussões sobre as características do meio de cultura (SMITH et al., 1997; CHAUHAN; KOTARI, 2004). Alguns trabalhos recentes realizados com crisântemo (BORGATTO, 2000), pata de vaca (DEFÁVARI, 2000) e cravo (HAYASHI, 2000) demonstram a forte influência do estado nutricional do explante sobre as respostas do cultivo *in vitro*. A vantagem de mapear as respostas da cultura a variações aplicadas a planta matriz é a possibilidade de desenvolver modelos de comportamento, determinar a extensão dos efeitos exógenos ou induzir respostas esperadas através do manejo adequado das matrizes.

2.3 Essencialidade dos nutrientes

Os elementos essenciais são atualmente classificados como macronutrientes e micronutrientes, de acordo com sua concentração relativa nos tecidos das plantas. Existem algumas maneiras de separá-los em categorias. Uma das mais usadas é a que os classifica de acordo com sua essencialidade. Isto é feito de acordo com 2 critérios. O primeiro critério, o direto, diz que: o elemento deve fazer parte de um composto ou de uma reação enzimática ou não enzimática crucial ao metabolismo. Já o segundo critério é subdividido em 3 requisitos, sendo eles:

- Na deficiência ou ausência do elemento a planta não completa seu ciclo vital;
- O elemento não pode ser substituído por nenhum outro. A deficiência do elemento só pode ser corrigida mediante o seu fornecimento;
- O elemento deve ter uma função direta na vida da planta e não exercer o papel de neutralizador de fatores físicos, químicos ou biológicos desfavoráveis à vida do vegetal.

Os elementos que favorecem o crescimento são classificados como benéficos (Silício, Sódio, Alumínio, Iodo), e os que não se enquadram nestas duas classes são considerados como tóxicos.

A classificação dos elementos minerais quanto a sua mobilidade é uma forma de facilitar a visualização de anomalias geradas pela deficiência de alguns nutrientes e fazer sua rápida reposição. Sua divisão pode ser feita de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 – Elementos minerais classificados com base em suas mobilidades dentro da planta e suas tendências de translocação durante deficiências

Móveis	Imóveis
Nitrogênio	Cálcio
Potássio	Enxofre
Magnésio	Ferro
Fósforo	Boro
Cloro	Cobre
Sódio	
Zinco	
Molibdênio	

Em 1987, Mengel e Kirkby propuseram organizar os elementos essenciais de acordo com seu papel bioquímico e função fisiológica (Tabela 4).

Tabela 4 - Classificação dos nutrientes minerais das plantas de acordo com a função bioquímica

Nutriente mineral	Função
Grupo 1	Nutrientes que fazem parte de compostos de carbono
N	Constituinte de aminoácidos, amidas, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, coenzimas, hexoaminas, etc.
S	Componente de cisteína, cistina, metionina e proteínas. Constituinte do ac. Lipóico, coenzima A, tiamina pirofosfato, glutatona, biotina, adenosina 5' fosfossulfato e 3 fosfoadenosina.
Grupo 2	Nutrientes que são importantes na armazenagem de energia e na integridade estrutural
P	Componentes de fosfato açúcares, ácidos nucleicos, nucleotídeos, coenzimas, fosfolípidos, ácido fítico, etc. Tem papel central nas reações que envolvem ATP.
Si	Depositada como sílica amorfa em paredes celulares. Contribui para que as propriedades mecânicas das paredes celulares, incluindo rigidez e elasticidade.
B	Complexos com manitol, manans, ácido polimanurônico e outros constituintes de paredes celulares. Envolvido no alongamento celular e o metabolismo de ácidos nucleicos.
Grupo 3	Nutrientes que permanecem na forma iônica
K	Requerido como cofator em mais de 40 enzimas. Principal cátion no estabelecimento do turgor celular e manutenção da eletro-neutralidade celular.
Ca	Constituinte da lamela média das paredes celulares. Cofator para algumas enzimas envolvidas na hidrólise do ATP e de fosfolípidos. Atua como mensageiro secundário na regulação metabólica.
Mg	Requerido por muitas enzimas envolvidas na transferência de fosfatos. Constituinte da molécula de clorofila.
Cl	Requerido nas reações fotossintéticas envolvendo a evolução do O ₂
Mn	Requerido para a atividade de algumas desidrogenases, descarboxilases, quinases, oxidases, peroxidases. Envolvido com outras enzimas ativadas por cátions e na evolução fotossintética de O ₂
Na	Envolvido na regeneração do PEP em plantas C ₄ e CAM.
Grupo 4	Nutrientes envolvidos em reações redox
Fe	Compõem citocromos, proteínas (fotossíntese, fixação de N ₂ e respiração).
Zn	Constituinte da álcool desidrogenase, desidrogenase glutâmica, anidrase carbônica, etc.
Cu	Componente do ácido ascórbico oxidase, tirosinase, monoamina oxidase, uricase, citocromo oxidase, fenolase, lacase, plastocianina.
Ni	Em bactérias fixadoras de N ₂ , é constituinte de hidrogenases.
Mo	Constituinte de nitrogenase, nitrato redutase, xantina desidrogenase

Fonte: (MENGEL; KIRKBY, 1987).

2.3.1 Potássio nas plantas

O potássio é um íon univalente, presente nas plantas como cátion K⁺ (TAIZ; ZEIGER, 2004), é o segundo nutriente requerido em termos de quantidade pelas plantas. Sua concentração no citossol varia de

100-200mM (SCHRÖPPEL-MEYER; KAISER, 1988), sendo que para um ótimo crescimento vegetal seus valores requeridos variam entre 2-5% do peso seco da parte vegetativa das plantas. É um nutriente caracterizado por sua alta mobilidade. Assim, em situações de deficiência, o K^{+1} pode ser re-mobilizado para as partes mais jovens da planta, aparecendo então, os sintomas iniciais de sua deficiência nas folhas mais velhas da base das plantas. Este também é o nutriente que aparece em maior concentração no floema.

Apesar de algumas membranas apresentarem alta permeabilidade ao K^{+1} (o que possibilita sua rápida entrada e/ou saída do citossol) a absorção deste nutriente é altamente seletiva e acoplada a atividade das membranas celulares.

O K^{+1} é um nutriente extremamente importante para as plantas que produzem amido, fibras e açúcares, sendo que sua absorção pode ser limitada em solos de altas concentrações de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+1} , Fe^{+2} onde existe uma inibição competitiva na absorção destes nutrientes. Em condições de campo é mais comum ocorrer a inibição ocasionada pelo Mg^{+2} . Sua entrada através da membrana ocorre pelo gradiente eletroquímico gerado pelas ATPases, e seu transporte pode ocorrer por canais ou proteínas transportadoras (TAIZ; ZEIGER, 2004).

2.3.1.1 Principais funções do potássio

A associação do K^{+1} a ânions desempenha um papel fundamental na regulação do potencial osmótico das células vegetais, sendo que no citossol, o K^{+1} pode ser substituído por outros cátions inorgânicos como Na^{+1} , Mg^{+2} e o Ca^{+2} e/ou orgânicos. Sua concentração nos vacúolos tem papel fundamental na extensão celular e turgor. Não faz parte de nenhuma molécula orgânica e forma apenas complexos fracos, a partir dos quais, é facilmente trocado ionicamente.

Pela sua alta concentração no citossol e cloroplasto o K^{+1} neutraliza ânions macromoleculares solúveis e insolúveis estabilizando o pH entre 7 e 8. Já a entrada de K^{+1} nas células guarda aumenta seu potencial osmótico o que resulta na entrada de água nas mesmas e finaliza com a abertura do estômato, porém, em condições de deficiência de K^{+1} , carboidratos podem contribuir substancialmente para a regulação osmótica das células-guarda (POFFENROTH et al., 1992). O K^{+1} também desempenha papel fundamental no transporte fonte dreno de fotossintetizados das folhas (fonte) para os órgãos não fotossintetizantes ou não auto-suficientes (dreno). Outra função do K^{+1} é contra balancear cargas de ânions

móveis no: citoplasma, cloroplastos, vacúolos, xilema e floema (como o transporte de NO_3^{-1} e malato no vegetal).

O K^{+1} também desempenha função metabólica, sendo que várias enzimas são dependentes ou estimuladas por ele (SUELTER, 1970). A citar aquelas envolvidas na fotossíntese e respiração (TAIZ; ZEIGER, 2004), isso ocorre por mudanças conformacionais no complexo proteína-enzima. Essas mudanças conformacionais nas enzimas induzidas por K^{+1} aumentam as velocidades das reações catalíticas, $V_{\text{máx}}$ e K_m (EVANS; WILDES, 1971).

Em muitos casos a expansão celular é consequência do acúmulo de K^{+1} nas células, isso pode ser notado em feijão (MENGEL; ARNEKE, 1982) e cenoura (PFEIFFENSCHENEIDER; BERINGER, 1989) que apresentam menores tamanhos celulares em suas folhas na falta deste nutriente.

Nas plantas deficientes de potássio ocorrem mudanças químicas incluindo: acúmulo de carboidratos solúveis, diminuição no teor de amido e acúmulo de compostos nitrogenados solúveis. Essas mudanças no metabolismo de carboidratos estão relacionados com a alta necessidade de potássio por algumas determinadas enzimas regulatórias, como a piruvato quinase e a fosfofruto quinase (LÄUCHLI; PFLUGER, 1978) e amido sintase (NITSOS; EVANS, 1969). Também enzimas da síntese de poliaminas são inibidas por altas concentrações de potássio (REGGIANI et al., 1993) e estimuladas por baixo pH. Como o K^{+1} tem a função dominante de manter o pH elevado no citoplasma, então, esta alta síntese de poliamina (principalmente o cátion divalente putrescina) é reflexo da homeostase do citossol. Em plantas deficientes em K^{+1} a concentração de putrescina corresponde a até 30% do déficit de K^{+1} (MURTY et al., 1971). Adicionalmente fornecido putrescina exógena, as plantas deficientes impedem o aparecimento de sintomas visíveis e aumentam o crescimento (TACHIMOTO et al., 1992).

Muitos trabalhos tem relacionado o papel fundamental que as poliaminas (PA) tem no crescimento e desenvolvimento vegetal, atuando como reguladoras deste crescimento. Sua biossíntese (BAGNI; TASSONI, 2001) e, mudança dos níveis endógenos pode estar relacionada a processos de estresse e desenvolvimento (SLOCUM; FLORES, 1991; GALSTON et al. 1997), que incluem respostas a estresses osmótico (FLORES; GALSTON, 1982; BASU; GHOSH, 1991), pH (YOUNG; GALSTON, 1983), nutriente (BASSO; SMITH, 1974; WATSON; MALMBERG, 1996; TAMAI et al. 1999). Plantas submetidas à deficiência de K^{+1} , são caracterizadas pelo aumento das concentrações da poliamina putrescina (RICHARDS; COLEMAN, 1952). Como a concentração endógena de poliaminas está relacionada ao crescimento e desenvolvimento é natural que fatores que afetem sua síntese influenciem diretamente a organogênese e diferenciação celular de plantas cultivadas *in vitro*.

2.4 Fosfoenolpiruvato Carboxilase (PEPC)

Plantas superiores, algas verdes e algumas bactérias possuem a enzima PEPC. Nas plantas consideradas superiores ela desenvolve uma série de papéis metabólicos (McNAUGHTON et al., 1989; VIDAL; CHOLLET 1997). Nas folhas de plantas que apresentam o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) e plantas C_4 a PEPC catalisa a fixação primária do CO_2 atmosférico. Nos tecidos não fotossintetizantes de plantas C_4 e plantas C_3 ela atua como enzima anaplerótica, com papel chave no metabolismo do carbono e nitrogênio (Figura 2). Em células guarda e nódulos radiculares de espécies leguminosas, a PEPC pode atuar como reguladora do pH e na síntese de malato. O AOA produzido pela PEPC também pode ser utilizado na síntese de aspartato durante a assimilação do nitrogênio. Sua atividade também reduz a concentração de PEP, que em altas concentrações inibe a fosfofrutoquinase (PLAXTON, 1996). *In vivo* a PEPC parece ativada ou desinibida após o fornecimento de nitrogênio em plantas e algas crescendo em condições limitantes deste nutriente (HUPE; TURPIN, 1994). Essa ativação sugere que a PEPC está sujeita a uma forma adicional de regulação metabólica (CHAMPIGNY; FOYER, 1992; MORAES; PLAXTON, 2000).

Figura 2 – Modelo para regulação alostérica da PK e PEPC. O controle coordenado por “efectores” alostéricos fornece o mecanismo de controle do fluxo glicossídico citosólico, divisão do PEP e assimilação de nitrogênio. A atividade da PK é inibida em condições de deficiência de K^+ , no qual o PEP segue preferencialmente a via da PEPC. AAT: aspartato aminotransferase; GS: glutamina sintetase; GOGAT: glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase; NO_2 : nitrito; NO_3 : nitrato; NH_4 : amônia; CO_2 : gás carbônico; Ciclo TCA: ciclo dos ácidos tricarboxílicos; 2-OG: 2-oxoglutarato (MORAES; PLAXTON, 2000)

Alguns trabalhos demonstram que a PEPC é uma enzima alostérica, inibida pelo L- malato e ativada por glicose-6-fosfato (G-6-P), (McNAUGHTON et al., 1989; VIDAL; CHOLLET 1997). Sua atividade em plantas C₃, C₄ e de tecidos não fotossintetizantes, respondem prontamente a vários metabólitos envolvidos no metabolismo de carbono/nitrogênio como: DL-isocitrato, L-aspartato e L-glutamato (RIVOAL et al., 1998; DUFF; CHOLLET, 1995; LEPORT et al., 1996; PODESTÁ; PLAXTON, 1994; ZHANG et al., 1995; LAW; PLAXTON, 1997; GOLOMBEK et al., 1999). Nas plantas C₄ e CAM os mecanismos de regulação alostérica e modificação covalente estão envolvidos na modulação da atividade desta enzima (CHOLLET et al., 1996; NIMMO, 1993; PODESTÁ; PLAXTON, 1994).

Resultados de estudos com PEPC purificadas de vários tecidos não fotossintetizantes, sugerem que, a fosforilação/desfosforilação e “effectors” são importantes mecanismos de regulação da PEPC das células de plantas C₃ (CHOLLET et al., 1996; PODESTÁ; PLAXTON, 1994; ZANG et al., 1995; LAW; PLAXTON, 1997; DUFF; CHOLLET, 1995; OSUNA et al., 1996). Existe atualmente na literatura evidências convincentes de que a fosforilação reversível da PEPC é de ocorrência universal (algas, bactérias, cianobactérias, plantas C₃, C₄, CAM e tecidos não fotossintéticos). Esta fosforilação ocorre num conservado resíduo de serina, localizado na posição “N” terminal do polipeptídeo (VIDAL; CHOLLET, 1997; NIMMO, 2003). A fosforilação é realizada por uma quinase específica por serina/treonina denominada fosfoenolpiruvato carboxilase quinase (PEPCK). O nível de fosforilação da PEPC é determinado principalmente pela PEPCK. O resultado da fosforilação é um declínio na sensibilidade a inibição causada pelo L-malato, e aumento na sensibilidade a ativação por G-6-P. Miyao e Fukayama (2003) demonstraram a perfeita regulação da PEPC determinado pela PEPCK. Em trabalho realizado com diversas plantas C₃ transgênicas, superexpressando o gene codificador da PEPC, não observaram variações em sua fisiologia. A desfosforilação da PEPC é realizada por uma fosfatase do tipo 2a (PP2A).

Como o PEP é um dos precursores da via do ácido chímico e se localiza num ponto de ramificação importante do metabolismo primário e secundário, a PEPC de folhas de plantas C₃ e C₄ são potentemente inibidas por vários subprodutos da via do ácido chímico, principalmente os flavonóides quercetina e rutina (PAIROBA et al., 1996; MORAES; PLAXTON, 2000). Embora flavonóides e fenóis estejam implicados em inúmeras funções em plantas incluindo a interação planta-patógeno, a relevância fisiológica desta inibição permanece obscura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do Centro de Biotecnologia Agrícola - (CEBTEC) do Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP, em Piracicaba.

3.1 Obtenção de plantas matrizes

Sementes de cenoura (*Daucus carota* L.), da variedade Brasília de alta seleção obtidas da empresa Agristar do Brasil Ltda, situada em Petrópolis - RJ, foram germinadas para obtenção das plantas matrizes utilizadas usadas neste trabalho.

Foram colocadas para germinar 2000 sementes em 20 caixas plásticas do tipo "gerbox" (12 x 16 x 4cm), em câmara de germinação, na ausência de luz, sob temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. As sementes foram colocadas sobre papel filtro, autoclavado (120°C e pressão de 1 atmosfera por 60 minutos), e umedecido com água destilada na quantidade correspondente a 3 vezes o peso do papel substrato. As sementes foram irrigadas diariamente por um período de cinco dias, quando 80% das plantas haviam emitido uma radícula de $\pm 0,1\text{cm}$. As plantas que apresentaram emissão da radícula foram transferidas para vasos localizados na casa de vegetação climatizada ($26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro).

Foram plantadas quatro sementes por vaso numa profundidade de 0,5cm. Utilizou-se como substrato, nesses vasos, areia de granulometria média adequadamente lavada e autoclavada (120°C e pressão de 1 atmosfera por 60 minutos). Durante os primeiros seis dias, período no qual ocorreu a emergência, as plântulas foram irrigadas apenas com água destilada.

3.2 Tratamento com as soluções nutritivas

Após seis dias de cultivo em vasos, as plântulas passaram a ser fertirrigadas com a solução nutritiva contendo $\frac{1}{4}$ ($58,5\text{mg.L}^{-1}$ de K^{+1}), $\frac{1}{2}$ (117mg.L^{-1} de K^{+1}), 1 (234mg.L^{-1} de K^{+1}), 2 (468mg.L^{-1} de K^{+1}) e 3 (702mg.L^{-1} de K^{+1}) vezes a concentração de potássio contida na solução de Sarruge (1975), conforme Tabela 5.

Tabela 5 – Composição química das diferentes soluções nutritivas (mL.L⁻¹) adaptada de Sarruge (1975), aplicado às plantas matrizes de *Daucus carota* para testar o efeito nutricional do K⁺ na calogênese, morfogênese na atividade da PEPCarboxilase

Soluções estoque		TRATAMENTOS				
		1	2	3	4	5
		¼ x	½ x	Test	2 x	3 x
KH ₂ PO ₄	M	1	1	1	1	1
KNO ₃	M	0,5	2	5	1	5
Ca(NO ₃) ₂	M	5	5	5	5	1
MgSO ₄	M	2	2	2	2	2
KCl	M	-	-	-	6	12
CaCl ₂	M	-	-	-	-	-
NH ₄ NO ₃	M	2,25	1,5	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	M	-	-	-	-	-
Mg(NO ₃) ₂	M	-	-	-	-	-
Micro*		1	1	1	1	1
Fe-EDTA**		1	1	1	1	1

*A solução de micronutrientes tem a seguinte composição (g.L⁻¹): H₃BO₃= 2,86; MnCl₂ . 4H₂O= 1,81; ZnCl₂= 0,10; CuCl₂=0,04 ; H₂MoO₄ . H₂O= 0,02.

**A solução de Fe-EDTA foi preparada segundo Jacobson (1951), dissolvendo-se 26,1g de EDTA em 286mL de NaOH 1N e 24g de FeSO₄ . 7H₂O, arejando-se por 12 horas de escuro e completando-se o volume à 1litro.

As doses do nutriente foram testadas em 18 repetições por tratamento, contendo 4 plantas por vaso. As soluções nutritivas foram preparadas segundo as recomendações de Sarruge (1975) e contiveram o nutriente em concentrações capazes de causar deficiência (¼ e ½ vezes a concentração de potássio da solução nutritiva), nutrição normal (concentração de potássio da solução nutritiva) e toxidez (2 e 3 vezes a concentração de potássio da solução nutritiva). As plantas mantidas em casa de vegetação receberam 100mL de solução nutritiva por vaso, 3 vezes por semana.

As coletas dos explantes foram realizadas aos 45 e 60 dias após o início dos tratamentos com soluções nutritivas (Tabela 6).

Tabela 6 - Tratamento nutricional com 5 diferentes concentrações de potássio referentes aquela da solução nutritiva, realizados em matrizes de *Daucus carota* L. e número de amostras coletadas/inoculadas ao longo dos tratamentos, após o início da aplicação das soluções nutritivas

Tratamentos	Duração do tratamento (em dias)	
	45	60
1) $\frac{1}{4} \times K^{+1}$ (58,5mg.L ⁻¹)	18	18
2) $\frac{1}{2} \times K^{+1}$ (117mg.L ⁻¹)	18	18
3) $1 \times K^{+1}$ (234mg.L ⁻¹)	18	18
4) $2 \times K^{+1}$ (468mg.L ⁻¹)	18	18
5) $3 \times K^{+1}$ (702mg.L ⁻¹)	18	18

3.3 Estabelecimento da cultura de calos.

3.3.1. Assepsia dos explantes

Como explantes foram utilizados segmentos do pecíolo foliar da terceira folha, a contar do ápice para a base das plantas matrizes.

Para assepsia o material coletado foi cortado em segmentos de aproximadamente 10 cm e mergulhados em água autoclavada contendo uma gota de Tween 80 (detergente neutro). Após, os segmentos foram levados para mesa de fluxo laminar e transferidos para frascos contendo solução de hipoclorito de sódio comercial 20% (v/v) acrescido de uma gota de Tween 80 e mantidos por 15 minutos sob agitação. Depois de lavados 3 vezes em água destilada, previamente autoclavada, os explantes foram cortados em tamanhos de 10mm de comprimento, sendo desprezadas as extremidades que estiveram em contato com a solução desinfestante.

3.3.2 Calogênese

Depois da assepsia apropriada os explantes foram inoculados em meio de cultura descrito por Murashige e Skoog (1962) contendo variáveis concentrações de K⁺¹ ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2 e 3 vezes a concentração de potássio do meio MS), acrescido de 0,1mg da auxina 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), 30g de sacarose e solidificado com 2,3 g de Phytigel (Sigma) por litro de meio. O pH da solução foi ajustado para 5,7 com NaOH e autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atmosfera por 20 minutos. A

composição do meio MS é apresentado na Tabela 7. os explantes permaneceram nestes meios de cultura em ausência de luz por 50 dias.

Tabela 7 – Componentes nutricionais do meio básico de Murashige e Skoog (1962), empregados na indução de calogênese em explantes de matrizes de *Daucus carota* L., e concentração das soluções estoque utilizadas no preparo dos meios de cultura

Componentes	Concentração Meio MS (mg.L ⁻¹)	Solução Estoque
Macronutrientes		Concentração 100x (g.L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650,0	165
KNO ₃	1900,0	190
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440,0	44
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370,0	37
KH ₂ PO ₄	170,0	17
Micronutrientes		
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	2,23
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6	0,86
H ₃ Bo ₃	6,2	0,63
KI	0,83	0,083
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25	0,025
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,0025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,042	0,0042
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	37,3	3,73
Fe-SO ₄ . 7H ₂ O	27,8	2,78
Vitaminas		
Ácido nicotínico	0,5	0,05
Tiamina	1,0	0,01
Piridoxina	0,5	0,05
Glicina	3,0	0,2
Inositol	100,0	10

Os meios de cultura utilizados possuíam, à semelhança dos tratamentos aplicados às plantas matrizes em casa de vegetação, um tratamento testemunha com meio MS completo, e quatro meios contendo variáveis concentrações de K⁺ (Tabela 8). Cada tratamento continha o nutriente potássio em concentrações supostamente capazes de causar deficiência (195,2mg.L⁻¹ e 391,85mg.L⁻¹), nutrição normal (783,7mg.L⁻¹) e toxidez (1567,4mg.L⁻¹ e 2351,1mg.L⁻¹).

Tabela 8 – Volume utilizado de soluções estoque para o preparo dos meios de cultura adaptados de Murashige e Skoog (1962), aplicados aos explantes de *Daucus carota* L. *in vitro* para testar o efeito nutricional em K^{+1} na calogênese, morfogênese e atividade da PECarboxilase

Soluções estoque	TRATAMENTOS				
	1	2	3	4	5
	$\frac{1}{4}x$	$\frac{1}{2}x$	Test.	2x	3x
NH ₄ NO ₃	13,55	12,35	10	10	10
KNO ₃	10	10	10	10	10
CaCl ₂ *	10	10	10	10	10
MgSO ₄	2,5	5,0	10	10	10
KH ₂ PO ₄	10	10	10	10	10
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-	-
MgCl ₂	-	-	-	-	-
KCl	-	-	-	20	40
Micro	10	10	10	10	10
Fe-EDTA**	10	10	10	10	10

* Preparar com água destilada previamente fervida.

** Dissolver Na₂EDTA e FeSO₄ separadamente a quente. Misturar as duas soluções, esperar esfriar e aferir o volume.

Explantes das plantas pertencentes a cada um dos cinco tratamentos *ex vitro*, após assepsia, foram inoculadas em 18 frascos de cada um dos cinco tratamentos contendo as variações de concentração de potássio do meio MS, perfazendo 25 tratamentos finais (Tabela 9). As duas coletas de explante ocorreram 45 e 60 dias após início da aplicação das soluções nutritivas. Estes foram utilizados para as avaliações de calogênese, morfogênese e influência sobre a atividade da PECarboxilase.

Cada frasco contendo 50mL de meio de cultura foi inoculado com 3 explantes peciolares assépticos, os quais permaneceram em sala de crescimento em ausência de luz a temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A avaliação de calogênese foi realizada sessenta dias após a inoculação com base na massa de matéria fresca e massa de matéria seca dos calos formados por explante.

Tabela 9 – Tratamento nutricional com 5 concentrações diferentes de potássio nas soluções nutritivas, realizados em matrizes de *Daucus carota*. Após a assepsia, os explantes das matrizes de cada tratamento *ex vitro* foram inoculados com 18 repetições de cada dos 5 diferentes meios de

cultura. Estes foram os 25 tratamentos finais nos quais analisou-se a calogênese, diferenciação celular e a atividade da PEPCarboxilase

Soluções nutritivas (ex vitro)	Meios de cultura (in vitro)	Tratamentos	Repetições	
			45 dias	60 dias
$\frac{1}{4} \times K^{+1}$	$\frac{1}{4} \times K^{+1}$	1	18	18
$\frac{1}{4} \times K^{+1}$	$\frac{1}{2} \times K^{+1}$	2	18	18
$\frac{1}{4} \times K^{+1}$	$1 \times K^{+1}$	3	18	18
$\frac{1}{4} \times K^{+1}$	$2 \times K^{+1}$	4	18	18
$\frac{1}{4} \times K^{+1}$	$3 \times K^{+1}$	5	18	18
$\frac{1}{2} \times K^{+1}$	$\frac{1}{4} \times K^{+1}$	6	18	18
$\frac{1}{2} \times K^{+1}$	$\frac{1}{2} \times K^{+1}$	7	18	18
$\frac{1}{2} \times K^{+1}$	$1 \times K^{+1}$	8	18	18
$\frac{1}{2} \times K^{+1}$	$2 \times K^{+1}$	9	18	18
$\frac{1}{2} \times K^{+1}$	$3 \times K^{+1}$	10	18	18
$1 \times K^{+1}$	$\frac{1}{4} \times K^{+1}$	11	18	18
$1 \times K^{+1}$	$\frac{1}{2} \times K^{+1}$	12	18	18
$1 \times K^{+1}$	$1 \times K^{+1}$	13	18	18
$1 \times K^{+1}$	$2 \times K^{+1}$	14	18	18
$1 \times K^{+1}$	$3 \times K^{+1}$	15	18	18
$2 \times K^{+1}$	$\frac{1}{4} \times K^{+1}$	16	18	18
$2 \times K^{+1}$	$\frac{1}{2} \times K^{+1}$	17	18	18
$2 \times K^{+1}$	$1 \times K^{+1}$	18	18	18
$2 \times K^{+1}$	$2 \times K^{+1}$	19	18	18
$2 \times K^{+1}$	$3 \times K^{+1}$	20	18	18
$3 \times K^{+1}$	$\frac{1}{4} \times K^{+1}$	21	18	18
$3 \times K^{+1}$	$\frac{1}{2} \times K^{+1}$	22	18	18
$3 \times K^{+1}$	$1 \times K^{+1}$	23	18	18
$3 \times K^{+1}$	$2 \times K^{+1}$	24	18	18
$3 \times K^{+1}$	$3 \times K^{+1}$	25	18	18

3.4 Diferenciação celular

Os calos foram transferidos para novos meios de cultura de mesma composição anterior (Tabela 8), sendo mantidos os tratamentos, mas sem fitorregulador. Os frascos foram mantidos sob condições de fotoperíodo de 16 horas de claridade e 8 horas de escuro, como forma de se induzir a morfogênese. A avaliação da diferenciação celular foi feita com base no número de plantas regeneradas por explante 50 dias após transferência dos calos para a presença de luz.

3.5 Atividade da enzima PEPCarboxilase

A atividade da PEPCarboxilase foi determinada pelo método de espectrofotometria descrito por Moraes e Plaxton, (2000). A reação da PEPCarboxilase foi acoplada a malato desidrogenase, analisada a 24°C, monitorando-se a oxidação do NADH a 340 nm, como esquematizado abaixo:

Para obtenção do extrato vegetal o material vegetal fresco (2,5g de calos), foi colocado em almofariz e mantido a temperatura de 4°C. Feita a maceração até a formação de uma pasta homogênea. Em seguida, foi adicionado 3mL de Tampão Triz-Base 50 mM, pH 8,4, glicerol 10% (v/v). O extrato foi centrifugado à 4°C e 18600 g por 20 minutos e aproveitado o sobrenadante.

O ensaio enzimático foi constituído por Tampão Triz-Base 50 mM, glicerol 10% (v/v), pH 8,4, PEP 2 mM, KH_2CO_3 , NADH 0,16 mM e 5 unidades de malato desidrogenase (E.C. 1.1.1.37) em volume final de 1mL. O início da reação deu-se com a adição de 100 μL de extrato vegetal em cubeta de quartzo, diretamente no espectrofotômetro. A reação foi monitorada por 10 minutos com leituras a 340 nm, em intervalos de 1 minuto. A atividade da enzima foi determinada seguindo-se a queda de absorbância a 340 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

3.6 Extração protéica

O material vegetal fresco (0,5g de calos), foi colocado em almofariz e mantido a temperatura de 4°C. Foi feita a maceração até a formação de uma pasta homogênea. Em seguida, foi adicionado 2,1 mL do Tampão Fosfato de Potássio 100 mM, pH 7,5 acrescido de 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e 5% (p/v) de PVPP. O extrato foi centrifugado à 4°C e 12300 g por 32 minutos e aproveitado o sobrenadante.

A concentração proteína foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm como descrito por Bradford, (1976). Para curva padrão foi utilizado albumina bovina sérica (BSA).

3.6 Delineamento estatístico e análise estatística

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, e a análise estatística dos resultados foram feitas utilizando-se o sistema para análise estatística SAS e as comparações de médias serão feitas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento das plantas matrizes

Ao longo do período de tratamento com as soluções nutritivas (45 e 60 dias), as plantas matrizes não apresentaram sintomas visíveis de deficiência ou toxidez. A deficiência visual é caracterizada na parte aérea quando as folhas adquirem uma tonalidade verde escuro ou azul esverdeado, semelhante à deficiência de fósforo (EPSTEIN; BLOOM, 2004). A deficiência deste nutriente também se caracteriza pelo aparecimento de manchas necróticas nas folhas, crescimento abaixo do normal e raras vezes (sob condições severas), morte de gemas laterais e terminais (TAIZ; ZEIGER, 2004). Como o potássio pode ser re-mobilizado para folhas mais jovens, esses sintomas aparecem inicialmente nas folhas mais maduras na base da planta (MARSCHNER, 1995).

Não se conhece sintomatologia que caracterize o excesso deste nutriente. Amaral (2003) constatou no cultivo da cenoura, mesmo não havendo sintomas visuais que estabelecessem deficiência ou toxidez, que o fornecimento de soluções nutritivas contendo variáveis concentrações de K^{+1} determinam o conteúdo deste elemento nos explantes utilizados para trabalhos em cultura de tecidos. A ausência de sintomas de deficiência ou toxidez também foi constatada em trabalhos realizados com cravo (HAYASHI, 2000) e pata de vaca (DEFÁVARI, 2000). O aparecimento de sintomas de deficiência pôde ser verificado em plantas de crisântemo apenas 45 dias após a ausência (0 mg.L^{-1}) de fornecimento deste elemento na solução nutritiva (BORGATTO, 2000). Estes fatos podem ser explicados em função da alta mobilidade do K^{+1} e também pelo fato que o sódio (Na^{+1}) pode substituir, em vários graus, o K^{+1} como osmótico vacuolar, sendo que isso não ocorre no citossol (EPSTEIN; BLOOM, 2004). Para alguns genótipos de beterraba (*Beta vulgaris*), até 98% do K^{+1} da solução nutritiva pode ser substituído por Na^{+1} sem resultar em variações no crescimento (SUBBARAO et al., 1999). Amaral (2003) também relatou o antagonismo na absorção de Ca^{+2} e Mg^{+2} ocasionada pelo aumento de concentração de K^{+1} fornecido na solução nutritiva. Neste caso o aumento do K resultou em decréscimo linear no teor de Ca^{+2} e Mg^{+2} presentes nos tecidos das plantas matrizes (AMARAL, 2003).

Para Hayashi (2000), essas condições são altamente favoráveis aos objetivos dos trabalhos que buscam determinar os efeitos nutricionais das plantas matrizes sobre seu cultivo *in vitro*, pois trabalha-se com soluções nutritivas capazes apenas de gerar imperfeições metabólicas, antes que sintomas de deficiência ou toxidez morfológicas sejam manifestadas.

4.2 Calogênese

O efeito de diferentes níveis de K^{+1} e da duração dos tratamentos na indução de calogênese, expresso em massa de matéria fresca (MF) e seca (MS), é apresentado nas Figuras 3 e 4. A calogênese induzida nos explantes foi influenciada significativamente pelos tratamentos para todos os níveis de K^{+1} na solução nutritiva e no meio de cultura.

Tratamentos de explantes com os mais baixos ou os mais altos de níveis de K^{+1} , tanto na solução nutritiva como no meio de cultura afetam negativamente a calogênese, cujos resultados mostraram-se diretamente relacionados com a duração dos tratamentos.

A calogênese tanto em massa de matéria fresca como em massa de matéria seca induzida nos explantes aos 60 dias foi da ordem de 2 vezes maior que a induzida aos 45 dias de tratamento. Na calogênese induzida, após 45 dias de tratamento, pôde ser observado que os explantes de matrizes tratados com 1 X e 3 X à concentração de K^{+1} da solução nutritiva de Sarruge (SN), houve acúmulo de MF crescente e proporcional até 2 X à concentração de K^{+1} do meio de cultura (Tabela 10). Este padrão de resposta pôde ser observado no acúmulo de MF das plantas tratadas por 60 dias com SN nas concentrações $\frac{1}{2}$ X, 1 X e 3 X a concentração de K^{+1} d da SN (Tabela 11). No acúmulo de MS (Tabela 12) esta resposta foi observada nas plantas tratadas apenas com a solução equivalente à de Sarruge aos 45 dias, e, nos tratamentos que receberam $\frac{1}{4}$ X, $\frac{1}{2}$ X e 1 X para plantas tratadas por 60 dias (Tabela 13).

Explantes de matrizes tratadas com 2 X a concentração de K^{+1} da SN (Tabelas 10 e 13), apresentaram acúmulo de MF e MS diretamente proporcional à concentração de K^{+1} do meio de cultura. Resposta idêntica foi constatada no acúmulo de MS pelos calos tratados com a solução 3 X. Os demais tratamentos tiveram resposta de máxima indução de calogênese no meio de cultura correspondendo ao meio MS (1 X). Os resultados deste trabalho estão de acordo com os dados encontrados na literatura sobre o efeito do K^{+1} no metabolismo do carbono e nitrogênio.

No presente, trabalho os explantes que apresentaram maior calogênese, de um modo geral, foram aqueles inoculados em meios contendo a concentração equivalente ao meio MS, 2 x e 3 X, com exceção daqueles oriundos de tratamentos com baixa concentração de K^{+1} na SN ($\frac{1}{4}$ X e $\frac{1}{2}$ X). O K^{+1} tem forte atuação nos processos relacionados a assimilação do CO_2 e nitrogênio (FLOWERS E LÄUCHLI, 1983). Células intactas submetidas à concentração externa de K^{+1} semelhante a do citossol, apresentam um aumento na fixação de CO_2 em mais de 3 vezes. Na presença de nitrogênio e suprimento adequado

de esqueletos carbônicos é relatado um aumento na assimilação de amônia. Este processo favorece a síntese de aminoácidos e consequentemente proteínas, necessárias para a regulação de processos metabólicos (DURZAM, 1985). Outro processo que pode ter efeito adicional à disponibilidade de K^{+1} , é o efeito osmótico e stress salino, resultado das altas concentrações de K^{+1} no meio de cultura (2 X e 3 X).

Cerca de 60 enzimas requerem pelo menos um cátion monovalente para sua ativação e, na grande maioria das vezes, o K^{+1} é esse cátion. Além disso, a concentração de K^{+1} para a ativação enzimática é bastante alta, na ordem de 50-100 mM (EPSTEIN; BLOOM, 2004). O potássio age como um ativador enzimático na fotossíntese e respiração, proporcionando esqueletos carbônicos para o metabolismo celular, apresentando neste caso relacionamento direto do balanço carbono-nitrogênio nas plantas, pois o potássio é também necessário para a síntese e ativação da nitrato redutase (MARSHNER, 1995). Em presença K^{+1} enzimas reguladoras da oxidação de carboidratos, como piruvato-quinase (EVANS; WILDES, 1971) e 6-fosfofrutoquinase (LÄUCHLI; PFLUGER, 1978), aumentam o metabolismo de carboidratos, promovendo a síntese de maior quantidade de ácidos orgânicos que em situações de disponibilidade de nitrogênio, regulada também pelo K^{+1} , promove a assimilação de amônia e consequentemente maior síntese de aminoácidos, proteínas e outros metabólitos celulares, aumentando o acúmulo de biomassa.

Em adição à ativação de enzimas, K^{+1} realiza três funções inter-relacionadas a citar a participação no transporte através das membranas, neutralização de ânions orgânicos (malato e citrato) e inorgânicos (cloro e nitrato) e manutenção do potencial osmótico. Com relação à neutralização de ânions o K^{+1} desempenha importante papel, não só relacionada a moléculas simples, mas também macromoléculas como proteínas e DNA (LIPPARD; BERG, 1994). Estas macromoléculas podem ser considerados polieletrólitos (SILVA; WILLIAMS, 1991). K^{+1} e outros íons estabilizam essas macromoléculas em sua conformação funcional (EPSTEIN; BLOOM, 2004). Com relação à função osmótica que o K^{+1} desempenha, em muitos casos, a expansão celular é consequência do acúmulo de K^{+1} nas células, isso pode ser observado em feijão (MENGEL; ARNEKE, 1982) e cenoura (PFEIFFENSCHENEIDER; BERINGER, 1989) que apresentam menores tamanhos celulares em suas folhas na falta deste nutriente.

Desde o trabalho realizado por Richards e Coleman (1952) caracterizando o aumento de poliaminas em situações de baixa disponibilidade de K^{+1} , diversos trabalhos têm demonstrado o efeito destas sobre o metabolismo das células. Estas substâncias desempenham papel fundamental como moduladoras da multiplicação celular, crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular. O fato da célula vegetal possuir e utilizar, na síntese de putrescina (Put) as vias arginina descarboxilase (ADC) e

ornitina descarboxilase (ODC), tem sido debatida nos últimos anos (COHEN, 1998). Autores sugerem que a Put formada por ambas as vias pode ocorrer em “pools” separados ou pode estar envolvido em funções fisiológicas distintas. Atualmente acredita-se que mudanças nos níveis de poliaminas estão associadas no controle do balanço entre divisão celular e diferenciação (GALSTON et al., 1997), sugerindo um aumento na atividade da ODC no momento de divisão celular e crescimento, enquanto que a via ADC predomina em tecidos maduros (FLORES, 1991), morfogênese e situações de stress.

Situações de deficiência de K^{+1} resultam em aumento dos níveis de Put para manutenção do balanço catiônico/aniônico. A principal rota de síntese desta Put é aumentando a atividade da ADC (BOUCHEREAU et al., 1999). Watson e Malmberg (1996) também constataram aumento na atividade da ADC relacionada à baixa concentração de potássio fornecidos às plantas de *Arabidopsis*. Este fenômeno, somado ao fato de que o K^{+1} possui papel fundamental na ativação de enzimas da fixação de CO_2 , oxidação de carboidratos e assimilação do nitrogênio, parece explicar a tendência de menor acúmulo de MF e MS nos calos oriundos de plantas matrizes tratadas com baixas concentrações de K^{+1} ($\frac{1}{4} X$ e $\frac{1}{2} X$), ou nos calos formados nos meios de cultura contendo $\frac{1}{4} x$ e $\frac{1}{2} X$ as concentrações de K^{+1} sugeridas por Murashige e Skoog em 1962.

Diversos estudos tem demonstrado a correlação entre o aumento dos níveis de poliaminas e divisão celular. A correlação entre a atividade da ODC e frequência de divisão foi determinada em suspensões celulares de *Nicotiana*. A DFMO (inibidor da ODC) resulta em inibição da divisão celular aplicado na cultura. A atividade da ODC é principalmente registrada em regiões meristemáticas (BAIS; RAVISHANKAR, 2002), já o acúmulo de PA tem sido relacionado a condições de estresse osmótico (BOUCHEREAU et al., 1999). Em alguns casos, os níveis de Put podem ser 60 vezes maiores que aqueles observados em plantas não estressadas osmoticamente (BAIS; RAVISHANKAR, 2002), indicando que ADC e ODC são necessárias para a síntese de Put nessas condições.

O efeito sobre a síntese de PA também tem sido relatado sob condições de stress salino (ERDEI et al., 1996). Essas variações no acúmulo de PA ocorrem entre e dentro das espécies. De modo geral, em espécies não tolerantes a stress salino diminuem os níveis endógenos de PA, principalmente Put, espermedina (Spd) e espermina (Spm) (PRAKASH; PRATHAPSEAN, 1986). Já em espécies tolerantes ocorre o acúmulo de Spd e Spm aumentando consequentemente a taxa Spd+Spm/Put (KRISHNAMURTHY; BHAGNAT 1984). Para Erdei et al., (1996) esse tipo de resposta ao stress salino pode ser considerado uma “resposta adaptativa”. Em milho WILLADINO et al., (1996), observaram maior calogênese no híbrido resistente (cv. Arizona) em relação ao híbrido não tolerante a stress salino (cv. W 64).

A cv. Arizona também apresentou aumentos nos níveis de Put e Spd, diferentemente da cv. W 64 que apresentou uma redução acentuada no nível de Spd.

A importância dos níveis de Spd e Spm está diretamente relacionada com a divisão celular. Na transição da fase G1 para a fase S, existe aumento da biossíntese destas PA, tanto em células animais como em células vegetais (FULLER et al., 1997). A taxa Spd+Spm/Put é relatada como um subproduto da biossíntese celular (LIN et al., 1984). A inibição da síntese destas PA interrompe a divisão celular na fase G1 (RUPNIAK; PAUL, 1978). O processo é restabelecido quando poliaminas são adicionadas ao meio de cultura e existe progressão para a fase S (FOWLER et al., 1996).

Estes fatos somados à importância do K^{+1} no metabolismo, ativação de enzimas e neutralização do pH (MARSHNER, 1995) podem ter favorecido a maior taxa de calogênese observada em alguns tratamentos testados neste trabalho.

Figura 3 – Massa Fresca dos calos induzidos em explantes de cenoura tratadas por 45 dias (A) e 60 dias (B) com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio

Figura 4 – Massa Seca dos calos induzidos em explantes de cenoura tratadas por 45 dias (A) e 60 dias (B) com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio

Tabela 10 – Calogênese (gramas de MF calo/explante) induzida em explantes de cenoura tratadas por 45 dias com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio

Meio MS	Solução Nutritiva				
	$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	$1 X [K^{+1}]$	$2 X [K^{+1}]$	$3 X [K^{+1}]$
$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	0,4664a*	0,6687b	0,8012ab	0,6083bc	0,3585c
$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	0,6696ab	0,5315b	0,5872bc	0,5349c	0,5777c
$1 X [K^{+1}]$	0,8095a	1,2401a	0,8847ab	0,8133bc	0,8951b
$2 X [K^{+1}]$	0,4198b	0,6824b	0,9666a	0,9173b	1,5196a
$3 X [K^{+1}]$	0,7044a	0,8153b	0,3240c	1,5515a	1,1511ab

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

Tabela 11 – Calogênese (gramas de MF calo/explante) induzida em explantes de cenoura tratadas por 60 dias com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio

Meio MS	Solução Nutritiva				
	$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	$1 X [K^{+1}]$	$2 X [K^{+1}]$	$3 X [K^{+1}]$
$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	0,6668b	0,7817c	1,3305bc	0,9823b	0,7083c
$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	1,4103ab	1,6171b	1,3326bc	1,5064ab	0,8589bc
$1 X [K^{+1}]$	1,5621a	1,9383ab	1,9889ab	2,1359a	1,2944abc
$2 X [K^{+1}]$	1,2542ab	2,4414a	2,1296a	1,7690a	2,0380a
$3 X [K^{+1}]$	1,1917ab	1,4455bc	0,6883c	1,7111ab	1,6132ab

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

Tabela 12 – Calogênese (gramas de MS calo/explante) induzida em explantes de cenoura tratadas por 45 dias com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio

Meio MS	Solução Nutritiva				
	$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	$1 X [K^{+1}]$	$2 X [K^{+1}]$	$3 X [K^{+1}]$
$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	0,0330a*	0,0377ab	0,0349ab	0,0371b	0,0271b
$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	0,0405a	0,0340ab	0,0422ab	0,0334b	0,0377ab
$1 X [K^{+1}]$	0,0400a	0,0513a	0,0491a	0,0421ab	0,0369ab
$2 X [K^{+1}]$	0,0292a	0,0344ab	0,0504a	0,0398b	0,0532a
$3 X [K^{+1}]$	0,0345a	0,0281b	0,0259b	0,0582a	0,0541a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

Tabela 13 – Calogênese (gramas de MS calo/explante) em explantes de cenoura tratadas por 60 dias com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio

Meio MS	Solução Nutritiva				
	$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	$1 X [K^{+1}]$	$2 X [K^{+1}]$	$3 X [K^{+1}]$
$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	0,0448a*	0,0467b	0,0586b	0,0634b	0,0588a
$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	0,0862a	0,0969a	0,0947ab	0,0925ab	0,0557a
$1 X [K^{+1}]$	0,0759a	0,0798ab	0,1094a	0,1091a	0,0538a
$2 X [K^{+1}]$	0,0876a	0,1223a	0,1105a	0,0758ab	0,0716a
$3 X [K^{+1}]$	0,0590a	0,0498b	0,0550b	0,0641b	0,0732a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade

4.3 Diferenciação celular

Os resultados obtidos para o tratamento de matrizes de cenoura por 45 e 60 dias com diferentes níveis de K^{+1} na solução nutritiva de Samuge e inoculados em meio de cultura MS contendo variáveis níveis de K^{+1} estão apresentados nas Figuras 5 e 6. A indução de diferenciação celular nos explantes de matrizes não teve influência significativamente nos tratamentos que receberam com $\frac{1}{2}x$ e $1x$ a concentração de K^{+1} da solução nutritiva por 60 dias. Entretanto, os demais tratamentos apresentaram diferença significativa tanto nas matrizes tratadas por 45 dias como as que receberam solução nutritiva por 60 dias (Tabelas 14 e 15).

A discussão dos resultados será feita com base no número de plantas diferenciadas por grama de massa seca de calos (taxa de diferenciação celular), uma vez que esta possibilita determinar o tratamento que apresentou maior taxa de indução embriogênica, independente do resultado de sua calogênese total (Tabelas 16 e 17). De um modo geral a maioria dos tratamentos apresentou maior taxa de embriogênese quando submetido aos extremos de concentração de K^{+1} (Figuras 5 e 6), ou seja, as matrizes tratadas por 45 e 60 dias com $\frac{1}{4}x$ e $3x$ a concentração de K^{+1} da SN. Os explantes com 45 dias inoculados nos meios MS contendo $\frac{1}{4}$ e $2x$ apresentaram resposta diretamente proporcional à concentração de K^{+1} da SN. Resposta inversa a esta, também aos 45 dias, foi observada no explantes inoculados no meio de cultura contendo $3x$ a concentração de K^{+1} do meio MS. Estes resultados demonstram uma forte correlação da composição do meio de cultura com o estado nutricional do explante, resultando em respostas distintas tanto sobre a calogênese quanto na indução da embriogênese somática.

É de consenso entre os pesquisadores que o crescimento e diferenciação de células podem ser alterados por vários componentes do meio de cultura. Com relação à diferenciação celular, o foco dos estudos relatam principalmente o efeito dos reguladores de crescimento sobre este. Em 1956, Richards e Coleman relataram o acúmulo de Put em plantas submetidas a deficiência de K^{+1} . Alguns anos após, em 1974, Basso e Smith comprovaram que a deficiência de potássio resulta no aumento dos níveis de Put em uma grande variedade de espécies. Young e Galston (1984), trabalhando com diversas monocotiledôneas demonstraram que em resposta a esse stress ocorre o aumento na atividade da ADC. O entendimento do processo de resposta à deficiência de K^{+1} nas dicotiledôneas é menor (WATSON; MALMBERG, 1996), mas de maneira geral, o acúmulo de Put em resposta a stresses ambientais tem sido correlacionado com o aumento na atividade da ADC (FLORES, 1991; TIBÚRCIO et al., 1994).

Diversos estudos tem relacionado o processo de síntese de PA, principalmente via ADC, com a embriogênese somática (MARTIN-TANGUY, 1997; BAIS; RAVISHANKAR, 2002). O efeito do estado nutricional do explante de matrizes de cenoura foi relatado, pela primeira vez, influenciar a diferenciação celular em 1967 por Reinert et al. Montague et al. (1979) foram os primeiros a demonstrar o aumento na atividade da ADC e no "pool" de Put quando induziram a embriogênese em cultura de células de cenoura. Em 1984, Freirer et al. relataram o efeito do DFMA (inibidor da ADC) no bloqueio da transição entre o crescimento desorganizado (calo) e o início da formação de embriões.

Em 1979 Montague et al., relataram o aumento da atividade da ADC e do "pool" de Put em plântulas induzidas embriogênicamente. Durante a embriogênese, a gradual redução da atividade da ODC observada (BOUCHEREAU et al., 1999), sugere que não só as células submetidas à deficiência de K^{+1} (com aumento apenas da atividade da ADC) apresentam altas taxas de embriogênese somática. De fato, células expostas a stress salino ou osmótico, quando induzidas à embriogênese (ausência de 2,4-D e presença de luz) apresentam taxas de diferenciação celular, tão altas, quanto calos submetidos à deficiência de K^{+1} (Figuras 5 e 6).

Este fenômeno parece explicar nossos resultados para 45 e 60 dias de tratamento, quando altas taxas de embriogênese somática foram obtidas utilizando-se explantes de matrizes tratadas com baixos níveis de potássio na solução nutritiva ou quando explantes foram inoculados em meio de cultura MS contendo as mais baixas concentrações de K^{+1} .

Figura 5 – Diferenciação celular em explantes de matrizes de cenoura, tratadas por 45 e 60 dias com variáveis níveis de potássio e cultivadas em meio de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes níveis de potássio. As Figuras A e B correspondem ao número de plantas diferenciadas, nos calos originados de matrizes tratadas por 45 e 60 dias, respectivamente, com soluções nutritivas

Figura 6 - Taxa de diferenciação celular em explantes de matrizes de cenoura, tratadas por 45 e 60 dias, com variáveis níveis de potássio e cultivadas em meio de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes níveis de potássio. Figuras A e B correspondem ao número de plantas diferenciadas por gramas de matéria seca de calos aos 45 e 60 dias respectivamente

Tabela 14 – Diferenciação celular (plantas/calos) em explantes de cenoura tratadas por 45 dias com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio

Meio MS	Solução Nutritiva				
	$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	$1 X [K^{+1}]$	$2 X [K^{+1}]$	$3 X [K^{+1}]$
$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	41,6c*	61,2b	150,9a	61,8c	101,4
$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	86,9b	91,9b	83,1b	76,8c	46,9b
$1 X [K^{+1}]$	121,7ab	89,7b	59,9b	97,3bc	62,6ab
$2 X [K^{+1}]$	117,9ab	78,5b	61,4b	134,4b	57,5b
$3 X [K^{+1}]$	144,1a	141,2a	159,9a	197,7a	70,1ab

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

Tabela 15 – Diferenciação celular (plantas/calos) em explantes de cenoura tratadas por 60 dias com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio

Meio MS	Solução Nutritiva				
	$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	$1 X [K^{+1}]$	$2 X [K^{+1}]$	$3 X [K^{+1}]$
$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	152,9ab	80,1b	99,8a	207a	164ab
$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	97,3b	75,7b	93,9a	194,6a	124,8b
$1 X [K^{+1}]$	122,2b	96b	93,2a	192,3a	142,4ab
$2 X [K^{+1}]$	220,2a	195,2a	102,4a	153,8a	201,2a
$3 X [K^{+1}]$	126,6b	216,4a	164,7a	134,8a	125,7b

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

Tabela 16 – Taxa de diferenciação celular (número de plantas diferenciadas por massa média de matéria seca de calos $\times 10^3$) em explantes de matrizes de cenoura, tratadas por 60 dias, com variáveis níveis de potássio e cultivadas em meio de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes níveis de potássio

Meio MS	Solução Nutritiva				
	$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	$1 X [K^{+1}]$	$2 X [K^{+1}]$	$3 X [K^{+1}]$
$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	1,26	1,62	4,32	1,66	3,74
$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	2,14	2,70	1,96	2,29	1,24
$1 X [K^{+1}]$	3,04	1,74	1,21	2,31	1,69
$2 X [K^{+1}]$	4,03	2,28	1,21	3,37	1,08
$3 X [K^{+1}]$	4,17	5,02	6,17	3,39	1,29

Tabela 17 – Taxa de diferenciação celular (número de plantas diferenciadas por massa média de matéria seca de calos $\times 10^3$) em explantes de matrizes de cenoura, tratadas por 60 dias, com variáveis níveis de potássio e cultivadas em meio de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes níveis de potássio

Meio MS	Solução Nutritiva				
	$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	$1 X [K^{+1}]$	$2 X [K^{+1}]$	$3 X [K^{+1}]$
$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	3,41	1,71	1,70	3,26	2,78
$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	1,12	0,78	0,99	2,10	2,24
$1 X [K^{+1}]$	1,61	1,20	0,85	1,76	2,64
$2 X [K^{+1}]$	2,51	1,59	0,92	2,02	2,81
$3 X [K^{+1}]$	2,14	4,34	2,99	2,10	1,71

4.4 Concentração de proteínas

O conteúdo de proteína presentes nos calos foi inversamente proporcional à concentração de K^{+1} usado para tratar as plantas matrizes de cenoura por 45 e 60 dias. Os resultados também indicam maior acúmulo de proteínas nos calos tratados com SN por um maior período de tempo (60 dias). Entretanto, os resultados não foram conclusivos. Variação de K^{+1} no meio de cultura não afeta a síntese de proteínas pelos calos, no que diz respeito ao conteúdo de proteína encontrado nos calos induzidos no meio de cultura contendo baixa concentração de K^{+1} tendendo a ser maior no meio contendo altas concentrações de potássio, principalmente pelos explantes de matrizes tratadas por 45 dias com concentração de K^{+1} na SN.

O baixo nível de proteína encontrado nos calos induzidos nos explantes extraídos de plantas matrizes de cenoura tratadas com alto níveis de potássio na SN pode ser reflexo da competição existente na absorção de cátions pelas células. Magnésio tem papel fundamental na síntese de proteínas e em diversas enzimas envolvidas na transferência do grupo fosfato (MARSCHNER, 1995), e a absorção de magnésio é severamente afetada pelas concentrações de K^{+1} presentes na SN (AMARAL, 2003).

Como o K^{+1} está envolvido na eficiente ligação entre tRNA e os ribossomos durante a síntese protéica, poderia se esperar uma redução no teor de proteínas totais, de forma contrária ao que foi demonstrado neste trabalho.

De fato, o K^{+1} é essencial em diversos processos metabólicos na célula vegetal, entre eles como ativador enzimático (MARSCHNER, 1995), mas como relatado por Dussert et al. (1995), também é consenso que a ativação da síntese de proteínas precede a diferenciação celular, e plantas que passam por um período maior de deficiência ou toxidez de nutrientes, provavelmente se encontram mais estressadas, influenciando na diferenciação celular (CHOI et al., 1998).

Outro fato que pode explicar o maior acúmulo de proteínas em baixas concentrações relaciona-se ao catabolismo de poliaminas realizado pela diamino oxidase (DAO) e poliamino oxidase (PAO). A ação da DAO converge em produção de ácido δ -amino butírico (GABA), o qual entra no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, via succinato, após ser transaminado e oxidado. Uma rota alternativa para a produção de GABA, em condições de stress, é através da descarboxilação do glutamato (SHELP et al., 1999). A PAO utiliza como substrato as poliaminas Spd e Spm, podendo resultar na formação de 3 produtos, a citar: pirrolina, 1,3-diaminopropano e 1(3-aminopropil)- pirrolina. Desta forma o 1,3 diaminopropano pode ser convertido em alanina.

Figura 7 – Concentração de proteínas solúveis induzidas em explantes de cenoura tratadas por 45 (A) e 60 dias (B) com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio

Tabela 18 – Concentração de proteínas solúveis induzidas em explantes de cenoura tratadas por 45 dias com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio (em 1 grama de calos)

Meio MS	Solução Nutritiva				
	$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	$1 X [K^{+1}]$	$2 X [K^{+1}]$	$3 X [K^{+1}]$
$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	7,281705	3,570403	4,530448	3,948305	2,174572
$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	3,973427	2,879042	9,480305	2,32748	1,897153
$1 X [K^{+1}]$	2,137437	3,779014	4,984805	1,803224	1,795578
$2 X [K^{+1}]$	3,311554	2,986076	2,130884	5,446807	2,996998
$3 X [K^{+1}]$	3,04287	3,195779	2,578686	4,603626	2,787297

Tabela 19 – Concentração de proteínas solúveis induzidas em explantes de cenoura tratadas por 60 dias com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio (em 1 grama de calos)

Meio MS	Solução Nutritiva				
	$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	$1 X [K^{+1}]$	$2 X [K^{+1}]$	$3 X [K^{+1}]$
$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	5,990722	7,926101	4,910534	2,453084	4,832987
$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	4,982621	4,765273	3,971243	7,918457	4,374264
$1 X [K^{+1}]$	3,373808	4,04005	3,078913	3,771369	4,246477
$2 X [K^{+1}]$	2,618006	4,97716	3,369439	5,097303	3,957042
$3 X [K^{+1}]$	4,575231	4,732506	2,169111	3,896972	5,293898

4.5 Atividade da PEPC

Durante a oxidação de carboidratos o PEP pode seguir duas rotas específicas de oxidação. Concentrações satisfatórias de K^{+1} permitem que a PK (enzima dependente de K^{+1}) converta o PEP a piruvato, possibilitando sua entrada no ciclo de Krebs. Este processo fornece esqueletos carbônicos necessários à síntese de aminoácidos. Sob condições de deficiência de K^{+1} a PK é inativa, e o PEP é convertido em AOA pela atividade da PEPC (enzima não dependente de K^{+1}). Após o AOA é convertido a malato e depois piruvato, possibilitando sua entrada no ciclo de Krebs. A análise da PEPC foi proposta neste trabalho como alternativa de explicar o fluxo do PEP, formado na glicólise, transferido para o ciclo de Krebs sob condições de deficiência de K^{+1} .

A variação da concentração de K^{+1} no meio de cultura não resultou em resposta conclusiva sobre a atividade da PEPC (Tabelas 20 e 21). Houve uma tendência de redução na atividade da PEPC relacionada com o aumento de K^{+1} na SN, principalmente em explantes tratados por 60 dias, porém os valores de sua atividade mantiveram-se altos nos calos de matrizes tratadas com 2X e 3 X a concentração de K^{+1} presente na SN.

Os altos valores de atividade da PEPC determinada nos explantes tratados com altas concentrações de K^{+1} por 45 e 60 dias podem ser resultado dos baixos valores de magnésio (Mg^{+2}) absorvido pelas plantas matrizes fornecedoras de explantes. Como descrito por Amaral (2003), tratamentos com 2 X e 3 X a concentração de K^{+1} presente na SN de Sarruge resultam em decréscimo de 25% e 50% nos teores de Mg^{+2} absorvido pelas plantas. O Mg^{+2} atua como cofator em diversas reações enzimáticas, principalmente naquelas envolvidas em transferência de grupo fosfato. Com a possível redução na atividade da PK, o PEP formado na glicólise utilizaria um "bypass" metabólico através da PEPC, como forma de suprir os esqueletos carbônicos necessários à síntese de aminoácidos. O resultado seria um conseqüente aumento na atividade desta enzima em condições de alta disponibilidade de K^{+1} fornecido às plantas matrizes.

Sabe-se também que a regulação da atividade da PEPC é realizada por modificação covalente e regulação alostérica (CHOLLET et al., 1996; NIMMO, 1993; PODESTÁ; PLAXTON, 1994). A modulação da atividade desta enzima é feita pela fosforilação reversível, resultado da ação de uma PEPCarboxilase-quinase independente de Ca^{+2} (PEP-CK) e desfosforilação por uma fosfatase do tipo 2A (CHOLLET et al., 1996; PODESTÁ; PLAXTON, 1994). A alta atividade da PEPC, relatada neste trabalho, sob condições de altas concentrações de K^{+1} disponível às células, poderiam ser conseqüência da baixa

concentração de proteínas constatada nessas condições. A interação entre fixação do carbono e a assimilação do nitrogênio é altamente modulada (HUPE; TURPIN, 1994), e envolve diversos passos de controle recíproco (CHAMPIGNY; FOYER, 1992; HUPPE; TURPIN, 1994). Nas folhas de plantas C_3 este controle é atribuído, principalmente, às enzimas sacarose-P sintase (SPS), nitrato redutase (NR) e PEPC. Acredita-se que a modulação de atividade entre essas 3 enzimas contribui para o controle no metabolismo da assimilação do nitrogênio, fixação e partição do carbono (CHAMPIGNY; FOYER, 1992). Duff e Chollet (1995), relataram a inibição da PEP-CK pela síntese de proteínas no citossol. Isso poderia ser um indício de que os altos valores de K^{+1} fornecidos nas SN e que afetam a síntese de proteínas (Figuras 7A e 7B) poderiam estar relacionadas à atividade da PEP-CK e estado de fosforilação da PEPC. Ou seja, o baixo nível de proteínas poderia ter contribuído para o aumento de atividade observado na PEPC tanto aos 45 como aos 60 dias (Figuras 8A e 8B), pelo fato da PEP-CK não sofrer inibição gerada pela síntese de proteínas no citossol (DUFF; CHOLLET, 1995).

Figura 8 - Atividade da PEPC induzidas em explantes de cenoura tratadas por 45 (A) e 60 dias (B) dias com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio

Tabela 20 – Atividade da PEPC em explantes de cenoura tratadas por 45 dias com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio

Meio MS	Solução Nutritiva				
	$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	$1 X [K^{+1}]$	$2 X [K^{+1}]$	$3 X [K^{+1}]$
$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	33,4741	29,3495	4,30937	16,3986	26,59306372
$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	41,8660	38,5863	65,5970	46,3422	34,99819993
$1 X [K^{+1}]$	3,69734	69,1983	17,6947	4,05136	30,45601824
$2 X [K^{+1}]$	12,0580	10,6108	8,42433	34,4389	47,33469339
$3 X [K^{+1}]$	11,2624	52,9929	23,8965	22,4276	52,72530901

Tabela 21 – Atividade da PEPC em explantes de cenoura tratadas por 60 dias com soluções nutritivas contendo variáveis níveis de potássio e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo diferentes concentrações de potássio

Meio MS	Solução Nutritiva				
	$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	$1 X [K^{+1}]$	$2 X [K^{+1}]$	$3 X [K^{+1}]$
$\frac{1}{4} X [K^{+1}]$	19,87159	30,57962	2,01488	3,781351	92,5597
$\frac{1}{2} X [K^{+1}]$	49,96879	31,54446	14,15456	4,244569	14,56618
$1 X [K^{+1}]$	28,79515	23,05532	15,53102	8,713548	16,33505
$2 X [K^{+1}]$	4,485779	17,94311	27,49309	31,96207	20,0924
$3 X [K^{+1}]$	6,848673	12,29929	8,487939	5,093003	4,179767

5 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos neste trabalho com comportamento *in vitro* (calogênese e diferenciação celular) de explantes, onde se variou a disponibilidade de potássio às matrizes as seguintes afirmações podem ser feitas:

- Ocorre menor indução de calogênese nos explantes de cenoura tratadas por 45 e 60 dias com soluções nutritivas e cultivadas por 50 dias em meio de cultura de Murashige e Skoog contendo as menores concentrações de potássio;
- A calogênese é afetada positivamente em função do período de cultivo dos explantes;
- Baixas e altas concentrações de potássio, tanto nas soluções nutritivas, como no meio de cultura, afetam positivamente a embriogênese somática. Sendo verificado as maiores taxas de diferenciação celular nestes tratamentos em relação à testemunha;
- As concentrações crescentes de potássio, fornecidas nas soluções nutritivas e no meio de cultura afetam negativamente o acúmulo de proteína nos calos;
- A variação nas concentrações de potássio no meio de cultura não resultou em resposta conclusiva sobre a atividade da PEPC. No entanto verificou-se a tendência de redução em sua atividade com o aumento de potássio nas soluções nutritivas até a concentração equivalente à de Sarruge. Em altas concentrações de potássio a PEPC sofreu aumento significativo de sua atividade.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. 1548 p.
- AMARAL, A.F.C. **Comportamento *in vitro* de explantes de matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.) tratadas com variáveis níveis de potássio**. 2003. 103 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2003.
- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P.V. et al. **Hand book of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. p. 82-123.
- AUDRAN, J. C.; DECOUT, E.; DUBOIS, T; GUEDIRA, M.; DUBOIS, J. AUDRAN, J.; VASSEUR, J. Role of temperature as a triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured *in vitro*. **Journal of Experimental Botan**, Oxford, v. 45, n. 281, p. 1859-1865, Dec. 1994.
- BAGNI, N.; TASSONI, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. **Amino Acids**, v. 20, n. 3, p. 301-317, 2001
- BAIS, H. P.; RAVISHANKAR, G. A. Role of Polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Pant Cell, Tissue and Organs Culture**, Netherlands, v. 69, p. 1-32, 2002
- BASU, R.; GHOSH, B. Polyamines in various rice genotypes with respect to sodium chloride salinity. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.82, p. 575-581, 1991.
- BASSO, L.C.; SMITH, T.A. Effect of mineral deficiency on amine formation in higher plants. **Phytochemistry**, New York, v. 13, p.875-883, 1974.
- BERCETCHE, J.; GALERNE, M.; DEREUDDRE, J. Efficient regeneration of plantlets from embryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst after freezing in liquid nitrogen. **Comptes Rendus de L'Académie des Sciences**, Paris, v. 310, p. 357-363, 1990.
- BHATNAGAR, P.; MINOCHA, R.; MINOCHA, S. Genetic metabolism of polyamines in poplar cells. The regulation of putrescine metabolism. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 128, p. 1455-1469, 2002.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice** (developments in crop science). New York: Elsiever Science, 1983. 502 p.
- BLEE, K.A.; WHEATLEY, E. R.; BONHAN, V. A.; MITCHELL, G. P.; ROBERTSON, D.; SLABAS, A. R.; BURREL, M. M.; WOJTASZEK, P.; BOLWELL, G. P. Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that

synthesises secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. **Planta**, Berlim, v. 212, p. 404-415, 2001.

BORGATTO, F. **Tratamento de plantas matrizes de *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. "Bi Time" com N, P, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ e calogênese *in vitro***. 2000. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2000.

BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, London, v. 140, p. 103-125, 1999.

BURGESS, J.; LINSTED, P. In vitro tracheary element formation: structural studies and the effect of tri-iodo benzoic acid. **Planta**, Berlim, v. 160, p. 481-489, 1984.

CAMARGO FILHO, W.P.; ALVES, H.S.; CAMARGO, A.M.M.P de. Mercado de cenoura no mercosul: análise da produção e de preços no Brasil e na Argentina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA 45., CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS 15., CONGRESSO BRASILEIRO DE CUTURA DE TECIDOS E DE PLANTAS 2., 2005. Fortaleza. Anais...Fortaleza 2005. p. 349-350.

CHAMPIGNY, M.L.; FOYER, C. Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis: basis for a new concept. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 101, p. 7-12, 1992.

CHAUHAN, M.; KOTHARI, S.L. Optimization of nutrient levels in the medium increases the efficiency of callus induction and plant regeneration in recalcitrant indian barley (*Hordeum vulgare* L.) *in vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, p. 520-527, Sep. 2004.

CHOLLET, R.; VIDAL, J.; O'LEARY, M.H. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 273-298, 1996.

COHEN, S.S. **A guide to the polyamines**. New York: Oxford University Press, 1998, 546 p.

DE BLOCK, M.; DE BROUWER, D.; TENNING, P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 91, 694-701, 1989.

DEFÁVARI, D. **Efeito do estado nutricional em Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺ de matrizes de *Bauhinia forficata* Link na calogênese *in vitro***. 2000. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2000.

- DUFF, S.M.G.; CHOLLET, R. In vivo regulation of wheat-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by a reversible phosphorylation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 107, p. 775-782, 1995.
- DUSSERT, S.; VERDEIL, J.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutrient up-take during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. **Plant Science**, London, v. 111, n.2, p. 229-236, 1995.
- DURZAN, D.J. Nitrogen metabolism and vegetative propagation of forest trees. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. 561p.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, p. 427-433, Oct. 2004.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Mineral nutrition of plants**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer, 2004. 403 p.
- ERICKSON, R.O. Nomogram for the plastochron index. **American Journal of Botany**, New York, v. 47, n. 5, 1960. Disponível em: <<http://links.jstor.org/sici?sici=0002-9122%28196005%2947%3A5%3C350%3ANFTPI%3E2.0.CO%3B2-Y>>. Acesso em: 29 jul. 2006.
- ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **Nutrient values and weights are for edible portion: *Daucus carota***. Washington, 2006. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl>. Acesso em 31 jul. 2006.
- ERDEI, L.; SZEGLETES, Z.; BARABAS, K.; PESTENACZ, A. Response in polyamine titer under osmotic salt stress in sorghum and maize seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 147, p. 599-603, 1996.
- EVANS, H.J.; WILDES, R.A. Potassium and its role in enzyme activation. In: COLLOQUIUM OF INTERNATIONAL POTASH INSTITUTE. **Proceedings...** Bern: IPI, 1971. p. 13-39.
- FEIRER, R. P.; MIGNON, G.; LITVAY, J. D. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in wild carrot. **Science**, New York, v. 223, p. 1433-1435, 1984.
- FERREIRA, M.D.; TRANI, P.E.; CASTELLANE, P.D. **Cultura da cenoura: recomendações gerais**. Guaxupé: Cooxupe, 1991. 20 p.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 402 p.
- FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Variation of histological patterns in tobacco callus during successive subcultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, n. 10, p. 1794-1800, 1985.

FLORES, H. E. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. In: SLOCUM, R.; FLORES, H. E. **The Biochemistry and Physiology to Polyamines in Plants**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 214-225.

FLORES, H.E.; GALSTON, A.W. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.69, p.701-706, 1982.

FLOWERS, T.L.; LÄUCHLIN, A. Sodium versus potassium: substitution and compartmentation: In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R.L. **Inorganic plant nutrition**. Berlin: Springer-Verlag, 1983. cap. 5.3, p.651-681.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. In _____. **Agrianual 2006: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2006. p. 255-256.

FOWLER, M. R.; KIRBY, M. J.; SVOTT, N. W.; SLATER, A.; ELLIOTT, M. C. Polyamine metabolism during the transition of autonomous sugar beet cell in suspension culture from quiescence to division, **Physiologia Plantarum**. Kobenhavn, v. 98, p. 439-446, 1996.

FULLER, D. J. M.; GEMER, E. W.; RUSSEL, D. H. Polyamine biosynthesis and accumulation during the G1 to s phase transition. *Cell Physiology*, v. 93, p. 81-85, 1997

GALSTON, A.W.; KAUR-SAWHNEY, R.; ALTABELLA, T.; TIBURCIO, A.F. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. **Botanical Acta**, v. 110, 1997, p. 197-207.

GAMBORG, O.L.; PHILLIPS, G.C. **Plant cell, tissue and organ culture – fundamental methods**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. 358 p.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2nd ed. London: Exegetics, 1993. 574 p.

GOLOMBECK, S. et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase in developing seeds of *Vicia faba* L. gene expression and metabolic regulation. **Planta**, Berlim, v. 208, p. 66-72, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/EMBRAPA, 1998. 509 p.

HAAG, H.P.; MINAMI, K. **Nutrição mineral em hortaliças**. Campinas: Fundação Cargill, 1981. 627 p.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspéctos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa, 1990. p. 204-212.

HAO, L.; ZHOU, L.; XU X.; CAO, J.; XI T. The role of salicylic acid and carrot embryogenic callus extracts in somatic embryogenesis of naked oat (*Avena nuda*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 85, p. 109-113, 2006.

HAYASHI, T.K. **Efeito do estado nutricional em N, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ de matrizes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L., CARYOPHYLLACEAE) na calogênese *in vitro***. 2000. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2000.

BAIS, H. P.; RAVISHANKAR, G. A. Role of Polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Pant Cell, Tissue and Organs Culture**, Netherlands, v. 69, p. 1-32, 2002.

HUPPE, H.C.; TURPIN, D.H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 45, p. 577-607, 1994.

JAIN, A.K.; SARKAR, A.; DATRA, R.K. Induction of haploid callus and embryogenesis in *in vitro* cultured anthers of mulberry (*Morus indica*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 44, n. 2, p.143-147, Feb. 1996.

KOMAMINE, A.; MURATA, N.; NOMURA, K. 2004 SIVB congress symposium proceeding: mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures – morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 41, p. 6-10, Jan. 2005.

KRISHNAMURTHY, R.; BHAGNAT, K.A. Polyamines as modulator of salt tolerance in rice cultivars. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 15, p. 500-504, 1974.

KUMAR, S.; AGARWAL, K.; KOTHARI, S.L. *In vitro* induction and enlargement of apical domes and formation of multiple shoots in finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. **Current Science**, Bangalore, v. 8, p. 1482-1485, 2001.

LÄUCHLI, A.; PFLÜGER, R. Potassium transport through plant cell membranes and metabolic role potassium in plants. In: CONGRESS INTERNATIONAL POTASH INSTITUTE. Anais... Bern, 1987, p. 111-163.

LAW, R.D.; PLAXTON, W.C. Regulatory phosphorylation of banana fruit phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 247, p. 642-651, 1997.

LEMOES, E.E.P.; FERREIRA, D. S.; ALENCAR, L. M. C.; NETO, C. E. R.; ALBUQUERQUE, M.M.. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n.10, p. 1359-1364, out. 2002.

LEPORT, L.; KANDLBINDER, A.; BAUR, B.; KAISER, W. M. Diurnal modulation of phosphoenolpyruvate carboxylation in pea leaves and roots as related to tissue malate concentrations and to the nitrogen source. **Planta**, Berlim, v. 198, p. 4695-4501, 1996.

LIN, P. P. C.; EGLI, C. B.; LI, G. M. MECKEL, L. Polyamine titer in the embryogenic axis and cotyledons of glycine max (L.) during seed growth and maturation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 76, p. 366-371, 1984.

LINCOLN, C.; LONG, J.; YAMAGUCHI, J.; SERIKAWA, K.; HAKE, S. Aknoted-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 1859-1876, 1994.

LIPPARD, S.J.; BERG, J.M. **Principles of Bioinorganic Chemistry**. Mill Valley: University Science Books, 1994. 441 p.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plantas. 2. ed. London: Academic Press, 1995. 889p.

MARTIN-TANGUY, J. Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. **Physiologia Plantarum**. Kobenhavn, v. 100, p. 675-688, 1997.

MASHAYEKHI, K; NEUMANN, K.H. Effects of boron on somatic embryogenesis of *Daucus carota*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 84, p. 279-283, Jan. 2006.

MAYER, U.; BUETTNER, G.; JIIRGENS, G. Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: Studies on the role of the *gnom* gene. **Development**, London, v. 117, p. 149-162, 1993.

MCNAUGHTON, G.A.; FEWSON, C. A.; WILKINS, M. B. NIMMO, H. G. Purification, oligomerization state and malate sensitivity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. **Biochemical journal**, London, v. 261, n. 2, p. 349-355, Jul 1989.

MENGEL, K.; ARNEKE, W.W. Effect of potassium on the water potential, the osmotic potential, and cell elongation in leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 54, p. 402-408, 1982.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principle of Plant Nutrition**. 4th ed., Bern: International Potash Institute, 1987. 655 p.

MICHALCZUK, L.; COOKE, T.J.; COHEN, J.D. Auxin levels at diferent stages of carrot somatic embryogenesis. **Phytochemistry**, New York, v.31, p. 1097-1103, 1992.

MINAS GERAIS (Estado). Agência Minas. Estado é o segundo produtor de cenoura do país. Minas Gerais, 2006. Disponível em :
<http://www.agenciaminas.mg.gov.br/detalhe_noticia.php?cod_noticia=2060>. Acesso em 31 jul. 2006.

- MIYAO, M.; FUKAYAMA, H. Metabolic consequences of overproduction of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 414, p. 197-203, 2003.
- MÖLLER, R., McDONALD, A. G.; WALTER, C.; HARRIS, P. J. Cell differentiation, secondary cell-wall formation and transformation of callus tissue of *Pinus radiata* D Don. **Planta**, Berlim, v. 217, p. 736-747, 2003.
- MÖLLER, R.; KOCH, G.; NANAYAKKARA, B.; SCHIMITT, U. Lignification in cell cultures of *Pinus radiata*: activities of enzymes and lignin topochemistry. **Tree Physiology**, Victoria, v.26, p. 201-210, 2006.
- MONTAGUE, M. J.; ARMSTRONG, T. A.; JARWOSKI, E. G. polyamine metabolism in embryonic cells of daucus carota. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 63, p. 341-345, 1979.
- MORAES, T.F.; PLAXTON, W.C. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brassica napus*_(repeased) suspension cell cultures. **European journal of biochemistry**, Oxford, v. 267, p. 4465-4476, 2000.
- MORINI, S.; D'NOFRIO, C.; BELLOCCHI, G.; FISICHELLA, M. Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quinee leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 63, p. 47-55, 2000.
- MURASHIGE, T.; NAKANO, R. Morphogenetic behavior of tobacco tissue cultures and implication of plant senescence. **American Journal of Botany**, New York, v. 52, p. 819-827, 1965.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.15, p. 473-497, Jul. 1962.
- MURTY, K.S.; SMITH, T.A., BOULD, C. The relation between the putrescine content and potassium status of black current leaves. **Annals of Botany**, Oxford, v. 35, p. 687-695, 1971.
- NAKANO, M. Mizunashi, K.; Tanaka, S.; Godo, T.; Nakata, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of several species in the genus *Tricyrtis*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, p. 274-278, Jun. 2004.
- NIMMO, H.G. **The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation** Post transcriptional modifications in plants. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1993. 161 p. (Society for experimental biology seminar series, 53).

- NIMMO, H.G. Control of the phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in higher plants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 414, p. 189-196, 2003.
- NITSOS, R.E.; EVANS, H.J. Effects of univalent cations on activity of particulate stasch synthetase. **Plant physiology**, Minneapolis, v. 44, p. 1260-1266, 1969.
- OSUNA, L.; GONZALEZ, C.; CEJUDO, F. J.; VIDAL, J.; ECHEVARRIA Achevarria. *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase from wheat seeds during germination. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 111, p. 551-558, 1996.
- PAIROBA, C.F.; COLOMBO, S.L.; ANDREO, C.S. Flavonoids as inhibitors of NADP malic enzyme and PEP carboxylase from two C₄ plants. **Biosciences, Biotechnology and Biochemistry**, Tokio, v. 60, 779-783 p., 1996.
- PFEIFFENSCHNEIDER, Y.; BERINGER, H. Measurement of turgor potential in carrots of different K nutrition by using the cell pressure probe. In: INTERNATIONAL POTASH INSTITUTE COLLOQUIUM. **Proceedings...** Bern: Farnham Royal, 1989. p. 203-217.
- PHILLIPS, G. Invited review: *in vitro* morphogenesis in plants – recent advances. In **Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, n. 4, p. 342-345, Jul. 2004.
- PLAXTON, W.C. The organization and regulation of plant glycolysis. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 185-214, 1996.
- PODDAR, K; VISHNOI, R.K.; KOTHARI, S.L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of NH₄NO₃ as replacement of NAA in the medium. **Plant Science**, Limerick, v. 129, p. 101-106, 1997.
- PODESTÁ, F.E.; PLAXTON, W.C. Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. **Planta**, Berlim, v. 194, p. 381-387, 1994.
- POFFENROTH, M.; GREEN, D.B.; TALLMAN, G. Sugar concentrations in guar cells of *Vicia faba* illuminated with red or blue light. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 98, p. 1460-1471, 1992.
- PRAKASH, L.; PRATHAPSEANAN, G. Effect of NaCl salinity and putrescine on shoot growth, tissue ion concentration and yeld of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Agronomy of Crop Science**, v. 160, p. 325-334, 1988.
- PULLMAN, G.S.; MONTEBELLO, P.; CAIRNEY, J.; XU, N.; FENG, X. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: maturation improvements by metal analysis of zygotic and somatic embryos. **Plant science**, v. 164, p. 955-969, 2003.

PURNHAUSER, L.; GYULIA, G. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 35, p. 131-139, 1993.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 38, p. 116-124, 2002.

REGGIANI, R.; AURISTANO, N.; MATTANA, M. et al. Influence of potassium ions on polyamine level in wheat seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 141, p. 136-140, 1993.

REINERT, J. Some aspects of embryogenesis in somatic cells of *Daucus carota*. **Phytomorphology**, New Delhi, v. 17, p. 510-517, 1967.

RICHARDS, F.J.; COLEMAN, E.G. Occurrence of putrescine in potassium deficient barley. **Nature**, London, v. 170, p. 460-461, 1952.

RIVOAL, J.; PLAXTON, W.C.; TURPIN, D.H. Purification and characterization of a high and low molecular isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Chlamydomonas reinhardtii*: kinetic, structural and immunological evidence that the green algal enzyme is distinct from the prokariotic and higher plant enzymes. **Journal of biochemistry**, Tokyo, v. 331, p. 201-209, 1998.

ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHÁVEZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. **Cultura de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 697-712.

ROUSTAN, J.P.; LATCHE, A.; FALLOT, J. Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 8, p. 182-185, 1989.

RUPNIAK, H. T.; PAUL, D. Inhibition of spermidine and spermine synthesis lead to growth arrest of the rat embryo fibroblasts in G1. **Cell Physiology**, v. 94, p. 161-170, 1978.

RUSSOWSKI, D. **Nitrogênio e fósforo na micropropagação de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. 2001. 105 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2001.

SARTORI, J.S. **Aspectos anatômicos da lâmina foliar de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. cultivada em diferentes condições ambientais**. 2000. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.

SCHRÖPPEL-MEIER, G.; KAISER, W. Ion homeostasis in chloroplasts under salinity and mineral deficiency: I. Solute concentrations in leaves and chloroplasts from spinach

plants under NaCl or NaNO₃ salinity. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 87, p. 822-827, Mar. 1988.

SHANNON, M.C.; GRIEVE, C.M. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Scientia Horticulturae**, New York, v. 78, p. 5-38, Dec. 1999.

SHELP, J. J.; BROWN, A. W.; McLEAN, M.D. Metabolism and functions of gamma-amino butyric acid. **Trends in the Plant Science**, London, v. 4, p. 446-452. 1999

SHIMAZU, T.; KURATA, K. Relationship between production of carrot somatic embryos and dissolved oxygen concentration in liquid culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 57, p. 29-38, 1999.

SILVA, J.J.R.F. da; WILLIAMS, R.J.P. **The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life**. Oxford, UK: Clarendon Press, 1991. 557 p.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimação *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pffafia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, Set. 2004.

SLOCUM, R.D.; FLORES, H.E. **Biochemistry and physiology of polyamines in plants**. Boca Raton: CRC Press. 1991. 640 p.

SMITH, R.A.; JACOBS, D.; DESAI, D.; GRUBER, J.; KITTIPONGPATANA, N.; GODIN, W.. Optimization of culture medium extends response time of embryogenic carrot cells but does not restore initial high response of young cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 49, p. 63-65, 1997.

SUBBARAO, G.V.; WHEELER, R.M.; STUTTE, G.W.; LEVINE, L.H. How far can sodium substitute for potassium in red beet?. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 22, p. 1745-1761, 1999.

SUELTER, C.H. Enzymes activated by monovalent cations. **Science**, New York, v. 168, p. 789-795, 1970.

TACHMOTO, M.; FUKUTOMI, M.; MATSUSHIRO. Role of putrescine in Lemna plants under potassium deficiency. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokio, v. 38, p. 307-313, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3rd ed. Sauderlands: Sinauer Associates, 2004. 719 p.

TAMAI, T.; INOUE, M.; SUGIMOTO, T.; SUEYOSHI, K.; SHIRAISHI, N; OJI, Y. Ethylene-induced putrescine accumulation modules K⁺ partitioning between roots and shoots in barley seedlings. **Physiologia Plantarum**, Ireland, n. 106, p. 296-301, Apr. 1999.

- THORPE, T.A. Somatic embryogenesis: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. **Korean Journal of Plant Tissue Culture**, v. 27, p. 245-258, 2000.
- TIBÚRCIO, A. F.; BESFORD, R. T.; CAPELL, T.; BORREL, A.; TESTILLANO, P. S.; RISUEÑO, M. C. Mechanisms of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 2, p. 1789-1800, 1994.
- VIDAL, J.; CHOLLET, R. Regulatory phosphorylation of C₄ PEP carboxylase. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 2, p. 230-238, 1997.
- WATSON, M.B.; MALMBERG, R.L. Regulation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh arginine decarboxylase by potassium deficiency stress. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 111, p. 1077-1083, 1996.
- WILLADINO, L.; CAMARA, T.; BOGET, N.; CLAPAROLS, I.; SANTOS, M.; TORNE, J. M. Polyamine and free amino acid variations in NaCl-treated embryogenic maize callus from sensitive and resistant cultivars. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.149, p. 179-185, 1996.
- XU, N.; BEWLEY, J.D. Contracting pattern of somatic and zygotic embryo development in alfafa (*Medicago sativa* L.) as revealed by scanning eletron microscopy. **Plant Cell Reports**, v.11, p. 279-284, 1992.
- YEN, H.E.; YEN, S.-K. Effect of high salinity on tracheary element differentiation in light-grown callus of *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 58, p. 59-65, 1999.
- YOUNG, N.D.; GALSTON, A.W. Putrescine and acid stress. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.71, p. 767-771, 1983.
- ZANG, X.; LI, B.; CHOLLET, R. *In vivo* regulatory phosphorylation of soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 108, p. 1561-1568, 1995.