**EFEITO DO ESTADO NUTRICIONAL EM Ca^{2+} , Mg^{2+} E K^{+}
DE MATRIZES DE *Bauhinia forficata* Link NA
CALOGÊNESE *IN VITRO***

DANIELA DEFÁVARI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **MURILO DE MELO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de Concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Julho de 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Defávári, Daniela

Efeito do estado nutricional em Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^{+} de matrizes de *Bauhinia forficata*
Link na calogênese *in vitro* / Daniela Defávári. - - Piracicaba, 2000.
72 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Cálcio 2. Cultivo in vitro 3. Cultura de tecido 4. Magnésio 5. Planta medicinal
6. Potássio 7. Solução nutritiva 8. Unha-de-vaca I. Título

CDD 633.88332

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

Aos meus pais, José e Dircéia, que
estiveram sempre me incentivando e
apoando, sem jamais medirem
esforços para concretizar minha
formação,

OFEREÇO.

Ao meu noivo Edilson, pelas horas
de incentivo, paciência,
compreensão e carinho,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Murilo de Melo, pela orientação, incentivo, apoio e amizade durante a realização deste trabalho;

Ao CEBTEC, pela oportunidade e apoio técnico recebidos;

Ao Departamento de Ciências Biológicas pela oportunidade concebida e pelos ensinamentos recebidos;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Departamento de Ciências Florestais pela doação das sementes de *Bauhinia forficata* Link utilizadas nos experimentos;

À Antonio Francisco de Campos Amaral, funcionário do Departamento de Ciências Biológicas - CEBTEC, pelo apoio técnico na realização dos experimentos;

Ao Prof. Marcelo Corrêa Alves, pelo apoio na realização das análises estatísticas;

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP que, de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho;

Aos funcionários do Setor de Biblioteca da ESALQ/USP, pelo auxílio prestado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
 1- INTRODUÇÃO.....	 1
 2- REVISÃO DE LITERATURA.....	 4
2.1- Importância da <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	4
2.2- Cálcio, Magnésio e Potássio no metabolismo celular de plantas.....	6
2.2.1- Cálcio.....	6
2.2.2- Magnésio.....	10
2.2.3- Potássio.....	12
2.3- Importância da cultura de tecidos em plantas.....	15
2.4- Nutrientes na cultura de tecidos.....	16
2.4.1- Cálcio.....	17
2.4.2- Magnésio.....	19
2.4.3- Potássio.....	20
 3- MATERIAL E MÉTODOS.....	 21
3.1- Obtenção de plantas matrizes com diferentes estados nutricionais.....	21
3.2- Estabelecimento da cultura de calos.....	24
3.3- Análise da concentração protéica nos calos.....	26
3.4- Análise Estatística.....	26

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1- Desenvolvimento das Plantas Matrizes.....	28
4.2- Calogênese.....	32
4.2.1- Cálcio.....	34
4.2.2- Magnésio.....	38
4.2.3- Potássio.....	41
4.3- Teor de Proteínas nos Calos.....	44
4.3.1- Cálcio.....	45
4.3.2- Magnésio.....	47
4.3.3- Potássio.....	49
 5- CONCLUSÕES.....	 52
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 53
 APÊNDICE.....	 68

LISTA DE FIGURAS

	Página
1- Efeito do tratamento de plantas matrizes com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente cálcio presente na solução nutritiva, no teor de massa de matérias fresca e seca foliar das plantas (g/planta).....	29
2- Efeito do tratamento de plantas matrizes com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente magnésio presente na solução nutritiva, no teor de massa de matérias fresca e seca foliar das plantas (g/planta).....	30
3- Efeito do tratamento de plantas matrizes com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente potássio presente na solução nutritiva, no teor de massa de matérias fresca e seca foliar das plantas (g/planta).....	31
4- Efeito do tratamento de plantas matrizes com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente cálcio presente na solução nutritiva, no teor de massa de matéria fresca de calos.....	36
5- Efeito do tratamento de plantas matrizes com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente cálcio presente na solução nutritiva, no teor de massa de matéria seca de calos (g/calos).....	37
6- Efeito do tratamento de plantas matrizes com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente magnésio presente na solução nutritiva, no teor de massa de matéria fresca de calos.....	39

7- Efeito do tratamento de plantas matrizes com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente magnésio presente na solução nutritiva, no teor de massa de matéria seca de calos (g/calor).....	40
8- Efeito do tratamento de plantas matrizes com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente potássio presente na solução nutritiva, no teor de massa de matéria fresca de calos.....	42
9- Efeito do tratamento de plantas matrizes com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente potássio presente na solução nutritiva, no teor de massa de matéria seca de calos (g/calor).....	43
10- Efeito do tratamento de plantas matrizes com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente cálcio presente na solução nutritiva, no teor de proteína dos calos secos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MMS calor).....	46
11- Efeito do tratamento de plantas matrizes com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente magnésio presente na solução nutritiva, no teor de proteína dos calos secos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MMS calor).....	48
12- Efeito do tratamento de plantas matrizes com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente potássio presente na solução nutritiva, no teor de proteína dos calos secos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MMS calor).....	50

LISTA DE TABELAS

	Página
1- Tratamento nutricional em Ca, Mg e K e número de amostras coletadas e inoculadas no longo dos tratamentos.....	22
2- Composição Química das Soluções Nutritivas (mL.L ⁻¹), aplicadas às plantas matrizes para testar o efeito nutricional em Ca, Mg e K na calogênese.....	23
3- Composição do meio de cultura utilizado para indução de calogênese em explantes, segundo formulação de Murashige & Skoog (1962).....	25
A1- Médias e coeficientes de variação das massa de matérias fresca e seca foliar de cada tratamento ao longo de 60 dias.....	69
A2- Médias e coeficientes de variação das massa de matérias fresca e seca e teor de proteínas dos calos para todos o tratamento testemunha e níveis de cálcio ao longo de 60 dias em vasos e 56 dias <i>in vitro</i>	70
A3- Médias e coeficientes de variação das massa de matérias fresca e seca e teor de proteínas dos calos para os níveis de magnésio ao longo de 60 dias em vasos e 56 dias <i>in vitro</i>	71
A4- Médias e coeficientes de variação das massa de matérias fresca e seca e teor de proteínas dos calos para os níveis de potássio ao longo de 60 dias em vasos e 56 dias <i>in vitro</i>	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μg = micrograma

μL = microlitro

2,4-D = ácido 2,4-dicloro fenoxiacético

3,4-D = ácido 3,4-dicloro fenoxiacético

ABA = ácido abscísico

ADP = adenosina difosfato

atm = atmosfera

ATP = adenosina trifosfato

ATPase = enzima adenosina trifosfatase

BAP = benzil amino-purina

BSA = soro albumina bovina

Ca²⁺ = íon cálcio

CaCl₂ = cloreto de cálcio

cm = centímetro

CO₂ = dióxido de carbono

DAG = diacilglicerol

GA = ácido giberélico

H⁺ = íon hidrogênio

H₃BO₃⁺ = ácido bórico

HCl = ácido clorídrico

IP₃ = inositol 1,4,5-trifosfato

K⁺ = íon potássio

K_m = constante de Michaelis

KOH = hidróxido de potássio

L = litro

mg = miligrama

Mg²⁺ = íon magnésio

mL = mililitro

mmol.L⁻¹ = milimol por litro

MMF = massa de matéria fresca

MMS = massa de matéria seca

Mn²⁺ = íon manganês

MS = Meio formulado por Murashige & Skoog (1962)

N = normal

Na⁺ = íon sódio

Na₂-EDTA = etilenodiaminotetraacetato de sódio

NAD = nicotinamida adenina dinucleotídeo

NH₄⁺ = íon amônio

nm = nanômetro

°C = grau centígrado

PEP = fosfoenol piruvato

P_i = fósforo inorgânico

PIP = fosfatidinositol-4,5-bifosfato

PLC = fosfolipase-C

RNA = ácido ribonucleico

RuBP = Ribulose 1,5-bisfosfato

v/v = volume por volume

V_{max} = Velocidade máxima de reação

**EFEITO DO ESTADO NUTRICIONAL EM Ca^{2+} , Mg^{2+} E K^{+} DE MATRIZES DE
Bauhinia forficata Link NA CALOGÊNESE *IN VITRO***

Autora: DANIELA DEFÁVARI

Orientador: Prof. MURILO DE MELO

RESUMO

Com o objetivo de testar a influência do estado nutricional de plantas matrizes de *Bauhinia forficata* Link na calogênese *in vitro*, plantas obtidas de sementes germinadas em areia lavada, após queda das folhas cotiledonares, passaram a ser irrigadas com soluções nutritivas contendo diferentes níveis de cálcio, magnésio e potássio. As concentrações das soluções nutritivas forneceram os níveis completos de nutrientes e $\frac{1}{4}\text{X}$, $\frac{1}{2}\text{X}$, 2X e 3X da solução completa de cada nutriente. A cada 15 dias de tratamento, explantes dessas plantas (segmentos de caule sem gemas axilares) foram coletados, desinfestados e inoculados em meio de cultura sólido MS acrescido de $1,5\text{mg BAP.L}^{-1}$ e $30\text{g sacarose.L}^{-1}$.

A calogênese em termos de massa de matéria fresca, seca e teor de proteínas foi afetada pelo estado nutricional em cálcio, magnésio e potássio das matrizes fornecedoras de explantes. A massa de matéria seca de calos foi maior em explantes de matrizes tratadas com baixos níveis de cálcio e principalmente com longa duração. Altos ou baixos teores de magnésio ou potássio afetaram negativamente a calogênese comparados com a solução nutritiva completa. O teor de proteína nos calos foi inversamente proporcional ao tratamento com cálcio e diretamente proporcional ao tratamento com potássio. Concentrações de magnésio superiores e inferiores aos da solução completa afetaram negativamente o teor de proteína dos calos.

EFFECT OF NUTRITIONAL STATUS ON Ca^{2+} , Mg^{2+} AND K^{+} OF *Bauhinia forficata* Link PLANTS ON CALOGENESIS *IN VITRO*

Author: DANIELA DEFÁVARI

Adviser: Prof. MURILO DE MELO

SUMMARY

Aiming at testing the effect of nutritional status of *Bauhinia forficata* Link plants on calogenesis *in vitro*, plants obtained from sand germinated seeds, after fall of cotyledonal leaves, were irrigated with nutritive solutions containing different levels of calcium, magnesium and potassium. The nutritive solutions provided the complete level of nutrients and levels of $\frac{1}{4}\text{X}$, $\frac{1}{2}\text{X}$, 2X and 3X of the complete level solution. At every 15 days of treatment, explants of these plants (stem segments without axial buds) were collected, disinfected and inoculated on MS solid culture medium supplemented with 1.5mg BAP.L^{-1} and $30\text{g sucrose.L}^{-1}$.

The calogenesis expressed as fresh and dry matter weight, and protein content was affected by the nutritional status on calcium, magnesium and potassium of the explant provider treated plants. The callus dry matter weight was higher for calli induced on explants from low level calcium treated plant and was treatment duration dependent. Levels of magnesium and potassium higher or lower than complete nutritive solution, affected negatively the calogenesis. The protein content of calli was inversely proportional to calcium treatments and directly proportional to potassium treatments. Levels of magnesium higher and lower than complete solution affected negatively the protein content of the calli.

1- INTRODUÇÃO

As plantas são usadas pelo homem há milhares de anos como fonte de alimentos, remédios, roupas e abrigos. Mesmo com o desenvolvimento da química, muitos extratos vegetais continuam sendo usados como remédios naturais ou como princípios ativos de remédios alelopáticos. A farmacopéia popular vem consagrando diversas plantas e seus extratos como remédios naturais milagrosos para muitos males, alguns destes sem tratamento eficaz ou de tratamento caro através da medicina convencional.

No Brasil é grande o número de infusões vegetais usadas como remédios sem qualquer acompanhamento médico, comprovação de sua eficiência ou conhecimento de sua composição bioquímica. A unha-de-vaca, como é conhecida a *Bauhinia forficata* Link por causa da forma de suas folhas, é conhecida na nossa farmacopéia como planta eficaz no tratamento da diabete. O chá ou a tintura de suas folhas serve para a cura da diabete, combate a urina solta (poliúria), reduz a excreção urinária às proporções normais e impede o aparecimento de açúcar na urina e no sangue, devido à sua ação hipoglucemiante (Vieira, 1992). Tem uso empírico, sendo utilizada também para combater a elefantíase e moléstias da pele, inclusive as de fundo sifilítico (Cruz, 1982). Apesar disso, sendo uma espécie não domesticada que não possui cultivos comerciais, foi pouco estudada e pouco se conhece sobre sua composição bioquímica e seu metabolismo.

Através das técnicas de cultura de tecidos tem-se conseguido a propagação de muitas espécies a partir de inúmeras partes da planta, como por exemplo: i) utilização de ápices e meristemas quando se deseja fazer micropropagação ou clonagem; ii) utilização

de segmentos vegetais para regeneração de plantas via organogênese ou embriogênese somática; iii) cultura de protoplastos para transformação de plantas; iv) cultura de células em suspensão para promover produção de metabólitos químicos, especialmente substâncias medicinais.

Na cultura de tecidos, o controle da morfogênese é feito através da introdução de sinais exógenos e de substratos, porém explantes de mesma natureza, retirados de plantas em diferentes condições fisiológicas podem apresentar respostas bastante distintas (Torres & Caldas, 1990).

Ainda de acordo com Torres & Caldas (1990), a morfogênese é fundamentalmente o resultado da 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 os responsáveis pela morfogênese. Em cultura de tecidos, o principal fator que controla a morfogênese são os fitorreguladores, particularmente o balanço [auxina]/[citocinina] no meio de cultura. Entretanto, fatores físicos também podem exercer efeitos, dentre eles: o estado físico do meio de cultura, os nutrientes, o pH, a temperatura e a luz. Esses efeitos, isolados ou sinergisticamente, variam de acordo com as condições de cada tipo de acordo com o tecido, órgão, espécie, variedade ou cultivar, e peculiar para uma dada condição fisiológica do momento, como por exemplo, o estado nutricional da planta matriz. Cálcio, magnésio e potássio são nutrientes que estão diretamente relacionados à ativação enzimática e desta forma, acredita-se que podem interferir no processo de diferenciação celular, estimulando ou inibindo a calogênese

Existem muitos trabalhos que relatam as técnicas da cultura de células ou tecidos, apresentando protocolo de cultivo para inúmeras espécies, porém são escassos os trabalhos que levam em consideração o nível de nutrientes que deve estar contido no meio de cultura para a maximização da calogênese. Trabalhos que venham a considerar o efeito do estado nutricional de plantas matrizes na calogênese são ainda mais escassos ou inexistentes.

Em vista disso o presente trabalho tem como objetivo testar a influência do estado nutricional de plantas de *B. forficata* em cálcio, magnésio e potássio na calogênese, utilizando como fonte de explantes para as induções *in vitro*, plantas de *Bauhinia forficata* Link cultivadas em vasos e irrigadas com soluções nutritivas contendo diferentes concentrações de cálcio, magnésio e potássio, procurando-se obter plantas com diferentes condições nutricionais desses nutrientes. As avaliações foram feitas com base em massa de matérias fresca e seca e teor de proteína dos calos.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Importância da *Bauhinia forficata* Link

A *Bauhinia forficata* Link, vulgarmente conhecida como unha-de-vaca, pata-de-vaca, pata-de-boi ou mororó, é árvore que atinge de seis a nove metros de altura em sua fase adulta, apresentando caule não muito lenhoso e ramos finos e frágeis (Corrêa, 1975). As folhas são parcialmente divididas em dois lobos lanceolados, palminérveas com nove nervuras principais e membranáceas. Os pecíolos são articulados com dois acúleos gêmeos em sua base e são alternos. As flores, brancas, possuem cálice em tubo fino e pétalas largo-lineares ou oblongas (Freise, 1933). A floração ocorre, normalmente, de novembro a dezembro. O fruto é uma vagem chata, característica da família Leguminosae-Caesalpinoideae, com até vinte e cinco centímetros de comprimento e grande número de sementes (Cruz, 1982).

A espécie *B. forficata* é originária da África e se distribui no sul e sudeste do Brasil, dispersa em meio a florestas tropicais, muitas de difícil acesso (Vieira, 1992). É muito comum nas matas, capoeiras e terrenos cultivados, sendo considerada padrão de terra boa (Kuhlman & Kühn, 1947). Explorada de forma extrativa, é uma fonte limitada de recursos e seus extratos são produzidos de maneira artesanal em pequena escala, tornando-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas de produção.

O uso da planta inteira, extraída do seu ambiente natural, não é racionalmente recomendado, devido: i) a sua dispersão por áreas de floresta, muitas de difícil acesso; ii) variação nos indivíduos dentro da população heterogênea, o que compromete o fornecimento dos compostos quantitativa e qualitativamente; iii) e a possível erradicação

da espécie. Uma alternativa é, evidentemente, a domesticação da espécie. Devido à grande diversidade entre os indivíduos da espécie, é necessário um programa de seleção de indivíduos mais produtivos e homogêneos para servirem de matrizes. Também serão necessárias experiências com populações homogêneas para se estudar os diversos fatores que atingirão o cultivo em escala comercial, como sistemas de manejo, exigências nutricionais e prováveis pragas e doenças que poderão afetar a cultura. Um programa deste exige grande investimento inicial e tempo para se obter um retorno financeiro. As incertezas políticas e a ausência de normas e comercialização do produto tornam esta alternativa inexequível a médio prazo (Payne, 1988).

Um programa de micropropagação *in vitro* é um importante meio de acelerar um programa de domesticação da espécie. Após a escolha das melhores matrizes em seu habitat, pode-se produzir grandes quantidades de mudas com a mesma capacidade genética de produção de metabólitos secundários que as matrizes.

As plantas produzem diversos tipos de compostos, as vezes considerados subprodutos de suas vias metabólicas, supostamente com a finalidade de proteção contra condições do meio ambiente ou insetos predadores. Estes compostos denominados de metabólitos secundários vêm sendo usados em diversas áreas de interesse para o homem, como conservantes e condimentos na alimentação, adoçantes naturais, óleos essenciais, inseticidas biológicos, tinturas na indústria têxtil, aromatizantes e perfumes, além de princípios ativos de produtos medicinais (Collins & Watts, 1983).

A maioria desses compostos ainda não pode ou não é economicamente viável de ser sintetizada artificialmente. O desconhecimento da bioquímica destes compostos (sua composição e seu metabolismo), como na *Bauhinia forficata* Link, dificulta o desenvolvimento das técnicas de produção e isolamento. Embora plantas inteiras sejam mais eficientes na síntese e no acúmulo de compostos secundários que células individuais (Desmarest & Dumanoir, 1982), a cultura destas pode ser mais produtiva com inclusão de precursores ou intermediários no meio de cultura (Aitchison et al., 1977).

A espécie em estudo neste projeto já é muito conhecida na medicina popular devido a sua ação anti-diabética, que foi comprovada por Juliane (1931) através de

acompanhamento clínico de pacientes com glucosúrias tratados com chás de extratos de suas folhas. Apesar da importância da unha-de-vaca, ela foi pouco estudada e pouco se conhece da sua composição bioquímica e do seu metabolismo. Por isto, existem muitas especulações sobre os compostos que poderiam promover as propriedades que lhe são atribuídas (Cruz, 1982).

Costa (1942) estudou a *Bauhinia forficata* Link, da qual extraiu diversas substâncias, identificando quercitina entre outras. Outra análise, feita por Miyake *et al.* (1986), destacou a presença de quercitina e substâncias correlatas. Outras espécies do mesmo gênero, também conhecidas como anti-diabéticas em suas regiões de ocorrência, têm sido estudadas e todas as análises têm constatado a presença de flavonóides, todos com estruturas semelhantes à quercitina. Por isto, vários autores vêm especulando que a ação hipoglucêmica das *Bauhinia* spp. é causada pelos flavonóides e estes têm sido os mais estudados.

2.2- Cálcio, Magnésio e Potássio no metabolismo celular de plantas

2.2.1- Cálcio

O íon cálcio desempenha papel chave numa remarcável variedade de atividades celulares importantes, incluindo divisão celular, secreção, endocitose, fertilização, transmissão sináptica, metabolismo, movimento celular (Karp, 1996; McLaughlin & Wimmer, 1999) e diferenciação de gemas axilares (Hepler & Wayne, 1985). Segundo Brownlee *et al.* (1999) evidências estão sendo acumuladas também na existência de função geral do Ca^{2+} na exocitose de plantas. Outra boa lista também pode ser citada de processos mediados por Ca^{2+} , incluindo contração citoplasmática em *Ernodesmis* (La Claire, 1982), migração do núcleo (Schnepf & Volkmann, 1974) induzidos por injúrias, regulação de volume em *Poterioochromonas* (Kauss, 1983), movimentos circadianos foliares (Satter & Galston, 1981; Toriyama & Jaffe, 1972), turgor de células guardas (Pallaghy, 1970), fusão de protoplastos (Boss *et al.*, 1984) e injúrias provocadas por baixas temperaturas (Woods *et al.*, 1984; Zocchi & Hanson, 1982).

O cálcio é considerado um nutriente atóxico, mesmo em altas concentrações, além de muito efetivo na desintoxicação de elevadas quantidades de outros nutrientes minerais em plantas. Sua taxa de absorção no citoplasma é severamente regulada e parece ser acoplada a processos metabólicos. A mobilidade do Ca^{2+} entre células e no floema é muito baixa, sendo o único nutriente mineral além de, possivelmente, boro que age fora do citoplasma, no apoplasto (Marschner, 1995), o que é resultado de uma abundância de sítios de ligação para Ca^{2+} nas paredes celulares e de um transporte controlado do cátion através da membrana plasmática para o citoplasma (Bush, 1995).

Existem duas áreas distintas na parede celular com elevada concentração de Ca^{2+} : a lamela média e a superfície externa da membrana plasmática. Em ambas áreas o Ca^{2+} tem funções estruturais essenciais: a regulação da permeabilidade da membrana e processos relacionados, e a resistência da parede celular, respectivamente. A degradação de pectatos é mediada pela galacturonase, que é drasticamente inibida por elevadas concentrações de Ca^{2+} . Assim, em tecidos deficientes em Ca^{2+} a atividade da poligalacturonase aumenta (Konno et al., 1984), resultando num sintoma típico de deficiência de cálcio: a desintegração das paredes celulares e o colapso de tecidos afetados, como pecíolos e partes superiores das hastes (Bussler, 1963).

A redistribuição intracelular do Ca^{2+} é o primeiro estímulo, ou age como mensageiro secundário (Marmé, 1983) no desencadeamento dos processos de maturação de frutos carnosos (Rigney & Wills, 1981). O nível de cálcio no citossol varia drasticamente em certas células vegetais em respostas a uma variedade de estímulos, incluindo mudanças de luz, pressão, gravidade e concentração de hormônios (Karp, 1996; Bush, 1995). É sugerido que mesmo alguns dos efeitos das citocininas em células vegetais ocorra através de modificações nos níveis de Ca^{2+} intracelular e de fosforilações protéicas como passos da transcrição, amplificação e diversificação da mensagem hormonal (Hepler & Wayne, 1985; Davies, 1995; Bush, 1995). De acordo com Davies (1995), estas evidências, porém são muito fragmentadas para descrever qualquer conclusão definitiva, mas talvez em plantas, assim como em animais, diferentes hormônios partilhem os mesmos mensageiros secundários. Sabe-se que quando

giberelinas, auxinas e citocininas estão agindo nas células ocorre oscilação no nível de Ca^{2+} no citossol (Hepler & Wayne, 1985; Bush, 1995).

Dos vários tipos de canais iônicos encontrados em plantas superiores, recentes descobertas têm indicado que canais de ânions, juntamente com canais de Ca^{2+} , desempenham um papel crítico e limitante na mediação dos primeiros eventos da tradução de sinais (Ward et al., 1995; Bush, 1995).

Algumas das respostas induzidas por cálcio são mediadas por um mensageiro secundário IP_3 (inositol 1,4,5-trifosfato), porém, vários outros fatores são conhecidos por causarem abertura temporária nos canais de Ca^{2+} do retículo endoplasmático liso ou da membrana plasmática. Outro mensageiro secundário capaz de causar abertura destes canais são os receptores rianodinos (Karp, 1996).

O Ca^{2+} que entra no citoplasma não age no estado iônico livre, mas se liga a uma das poucas proteínas ligadoras de cálcio, que leva ao desencadeamento da resposta (funcionando como um mensageiro secundário). Apenas uma das proteínas ligadoras de Ca^{2+} é bem distribuída no citoplasma, a calmodulina (polipeptídeo pequeno que possui 4 sítios de ligação para o Ca^{2+} , bastando a ligação de apenas um átomo de Ca^{2+} para que a conformação da proteína seja alterada, aumentando sua afinidade com o substrato) (Karp, 1996). Segundo Cheung (1980), muitos dos efeitos do Ca^{2+} parecem ser exercidos através de enzimas reguladas pela calmodulina.

O Ca^{2+} está também envolvido na divisão celular (Burström, 1968; Schmit, 1981), sendo a paralisação do crescimento radicular, na ausência de cálcio exógeno, o primeiro resultado da inibição da expansão celular. O crescimento dos tubos polínicos também é dependente da presença de cálcio no meio de crescimento, e a direção do crescimento é controlada quimiotropicamente pelo gradiente extracelular de Ca^{2+} (Mascarenhas & Machlis, 1964; Brownlee et al., 1999). Elevadas concentrações de cálcio inibem formação de colchicina em *Colchicum autumnale* (Hayashi, et al., 1988) e inibe o crescimento de plantas (Hepler & Wayne, 1985).

Auxinas estão envolvidas no transporte de Ca^{2+} entre tecidos vegetais, uma vez que a inibição do transporte deste cátion ou o declínio no nível de auxina induzem

sintomas de deficiência de cálcio (Marschner, 1995). Porém, ao mesmo tempo, o Ca^{2+} estabiliza as paredes celulares, ação que é contrária à extensão celular induzida por auxina (Cleland & Rayle, 1977).

O cálcio estabiliza as membranas celulares através da ligação de grupos fosfato e carboxilato a fosfolipídeos (Caldwell & Haug, 1981) e proteínas (Legge et al., 1982). Deve existir um intercâmbio entre o Ca^{2+} destes sítios de ligação e outros cátions (como K^+ , Na^+ ou H^+), entretanto estes não podem substituir o Ca^{2+} na estabilização das membranas; mesmo o cátion divalente Mg^{2+} não pode substituir o Ca^{2+} neste processo (Van Steveninck, 1965). Para desempenhar esta função na membrana plasmática o Ca^{2+} deve estar presente na solução externa, onde regula a seletividade de absorção de íons e previne a saída de soluto do citoplasma. O efeito do Ca^{2+} na proteção da membrana é mais efetivo sob várias condições de estresse, como baixas temperaturas (Zsoldos & Karvaly, 1978) e anaerobiose (Marschner, 1995).

Diferente do Mg^{2+} , que é um forte ativador de enzimas, o Ca^{2+} aumenta a atividade de poucas enzimas. Estas incluem α -amilase, fosfolipases e ATPases (Wyn Jones & Lunt, 1967). No caso da α -amilase, o efeito do Ca^{2+} depende da presença do fitorregulador GA (Jones & Carbonell, 1984). Em geral o Ca^{2+} estimula enzimas ligadas à membrana, particularmente ATPases da membrana plasmática de raízes de certas espécies (Kuiper et al., 1974). Por outro lado, o efeito inibidor do Ca^{2+} em várias enzimas localizadas no citoplasma e nos cloroplastos tem sido bem documentado. Hexodifosfatase (Baier & Latzko, 1976) e PEP carboxilase (Miller & Evans, 1957; Tomlinson & Turner, 1973) são dois exemplos de enzimas inibidas por Ca^{2+} .

Como a PEP carboxilase é uma enzima para fixação de CO_2 em espécies C_4 , nível muito baixo de Ca^{2+} livre no cloroplasto é prérequisito para uma alta taxa de fotossíntese. Da mesma forma, em espécies C_3 a fixação de CO_2 cessa abruptamente se a concentração de Ca^{2+} no estroma de cloroplastos atinge os níveis de Mg^{2+} (Portis Jr. & Heldt, 1976).

Existe uma aceitação geral de que o nível de Ca^{2+} livre no citoplasma e nos cloroplastos é muito baixo (Marschner, 1995). Este nível deve ser mantido para prevenir a precipitação de P_i , competição com Mg^{2+} por sítios de ligação, e inativação ou ativação

descontrolada de certas enzimas (McLaughlin & Wimmer, 1999). Como, exatamente, as células podem controlar os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} livre, não está bem definido, porém algumas das possibilidades são: a membrana plasmática apresenta uma barreira efetiva à penetração de Ca^{2+} ; a calmodulina (proteína que se liga ao Ca^{2+} regulando enzimas em células animais) é também importante em células vegetais para a regulação do Ca^{2+} livre no citossol, devendo controlar o transporte de Ca^{2+} entre células, assim como mediar a transferência de Ca^{2+} aos vacúolos (Marmé, 1983); e para a ativação enzimática (Marmé, 1983; Dieter, 1984), ativando um bom número de enzimas chaves como a fosfolipase (Leshem et al., 1984) e NAD quinase, provavelmente pela formação dos complexos cálcio/calmodulina com as enzimas (Dieter, 1984).

2.2.2- Magnésio

A taxa de absorção de Mg^{2+} pode ser fortemente diminuída por outros cátions como K^+ e NH_4^+ (Kurvits & Kirkby, 1980), Ca^{2+} e Mn^{2+} (Heenan & Campbell, 1981).

As funções do Mg^{2+} nas plantas estão relacionadas à sua mobilidade entre as células, capacidade de interação com grupos fosforils através de ligação iônica, e por agir como elemento de ligação entre complexos de diferentes estabilidades ou na formação destes. Uma grande proporção do Mg^{2+} total está envolvida na regulação do pH celular e no balanço cátion-ânion (Marschner, 1995).

O magnésio possui várias funções importantes na planta e está envolvido como um ativador de numerosas enzimas. É um elemento crítico em reações que envolvem ATP e transferência de fosfato, onde promove a ligação da molécula de ATP ao sítio ativo da enzima (Hopkins, 1995). Sabe-se também que, em alguns casos, o cálcio e o magnésio podem se substituir na ativação de enzimas.

A principal função do Mg^{2+} , e certamente a mais familiar, é o seu papel como átomo central da molécula de clorofila, embora apenas uma pequena porção do magnésio se encontre ligada à clorofila (Marschner, 1995).

O Mg^{2+} desempenha função essencial também como um elemento ponte para a agregação de subunidades de ribossomos (Camarano et al., 1972), processo necessário

para a síntese de proteínas. Quando os níveis de Mg^{2+} são deficientes, ou na presença de níveis excessivos de K^+ (Sperrazza & Spremulli, 1983), as subunidades se desassociam e a síntese protéica cessa. O magnésio é também necessário para a RNA polimerase e promove a formação de RNA no núcleo. Em resposta à deficiência de magnésio, a síntese de RNA pára imediatamente, porém é rapidamente reiniciada após adição de Mg^{2+} .

A necessidade por Mg^{2+} na síntese protéica pode ser demonstrada também nos cloroplastos. Em células foliares, pelo menos 25% do total de proteínas se localiza nos cloroplastos. Isto explica porque a deficiência de magnésio, particularmente, afeta o tamanho, estrutura e função dos cloroplastos, incluindo o transporte de elétrons no fotossistema II (McSwain et al., 1976). Amido é acumulado em cloroplastos deficientes em magnésio (Vesk et al., 1966), provocando um aumento na massa de matéria seca de folhas deficientes. Porém o sintoma de deficiência visível mais óbvio é a clorose generalizada das folhas (Marschner, 1995).

Existe uma longa lista de reações enzimáticas que requerem ou são promovidas por Mg^{2+} , como as reações de transferência de fosfatos (fosfatases e ATPases) ou de grupos carboxilos (carboxilase). O substrato para muitas ATPases, quinases e fosfatases é Mg-ATP, apresentando máxima atividade na presença de concentração adequada de ambos Mg^{2+} e K^+ (Marschner, 1995).

A síntese de ATP (fosforilação de ADP) tem uma necessidade absoluta por Mg^{2+} como um componente de ligação entre o ADP e a enzima. Outra reação relevante que depende do Mg^{2+} é a modulação da RuBP carboxilase no estroma de cloroplastos. A ligação de Mg^{2+} à enzima aumenta a afinidade pelo substrato CO_2 e a taxa de conversão V_{max} (Sugiyama et al., 1968). O magnésio também propicia o pH ótimo da reação em direção à taxa fisiológica. Nos cloroplastos a ativação da RuBP carboxilase mediada pela luz está relacionada com aumento de pH, o qual é dependente da concentração de Mg^{2+} no estroma. Também para a atividade da enzima piruvato quinase de plantas superiores o Mg^{2+} é necessário (Miller & Evans, 1957), causando aumento na velocidade da reação (Tomlinson & Turner, 1973).

Uma das enzimas chave que requer grande necessidade de Mg^{2+} e pH ótimo elevado é a frutose-1,6-difosfatase (Baier & Latzko, 1976). Outra enzima com necessidade similar pelo Mg^{2+} é a glutamato sintase (O'Neil & Joy, 1974).

2.2.3- Potássio

A taxa de absorção de K^+ é altamente seletiva e diretamente acoplada à atividade metabólica. É caracterizado pela sua alta mobilidade nas plantas (entre células individuais, entre tecidos, assim como a longa distância, transportado via xilema e floema). O potássio é o cátion mais abundante no citoplasma, e os sais de potássio desempenham grande contribuição ao potencial osmótico de células e tecidos vegetais (Marschner, 1995). Como o sódio em tecidos animais, presta função importante na regulação osmótica (Hopkins, 1995). Em quase todos os casos, as concentrações de K^+ citoplasmáticas são mantidas num nível relativamente controlado, enquanto que nos cloroplastos existe maior variação. As funções do K^+ na expansão celular e em outros processos de regulação de turgor estão relacionados às concentrações de K^+ nos vacúolos (Marschner, 1995).

Diferente de Ca^{2+} e Mg^{2+} , que têm importantes funções estruturais mas mobilidade limitada, o K^+ age principalmente como um carregador iônico de alta mobilidade que forma apenas complexos iônicos fracos que são prontamente trocados (Wyn Jones et al., 1979). Altas concentrações de K^+ são requeridas no citoplasma e nos cloroplastos para neutralizar os ânions macromoleculares solúveis (ácidos orgânicos e ânions inorgânicos) e insolúveis, estabilizando o pH entre 7 e 8, ótimo para muitas reações enzimáticas, nesses compartimentos. No citoplasma e no cloroplasto, o K^+ também contribui muito para a pressão osmótica e, sendo um cátion monovalente, não compete fortemente pelos sítios de ligação que requerem cátions divalentes (Marschner, 1995).

Além das suas funções na estabilização do pH, balanço iônico e osmorregulação, o K^+ é necessário para a ativação de enzimas e para processos de transportes membranares. Existem mecanismos (bombas) na membrana plasmática e, provavelmente

também, no tonoplasto para concentrar K^+ no citoplasma, contrariamente às restrições à entrada de Ca^{2+} .

O íon potássio é responsável por ativar grande número de enzimas, especialmente aquelas envolvidas na fotossíntese e respiração. A síntese de amido e proteínas também são afetadas pela deficiência deste nutriente (Hopkins, 1995). Existem mais de 50 enzimas que são completamente dependentes ou estimuladas pelo K^+ (Suelter, 1970). O potássio e outros cátions monovalentes ativam enzimas através da indução de mudanças conformacionais na enzima. Em geral, mudanças conformacionais nas enzimas induzidas pelo K^+ aumentam a taxa de reações catalíticas (V_{max}) e em alguns casos também a afinidade pelo substrato (K_m) (Evans & Wildes, 1971).

Em plantas deficientes em potássio algumas mudanças químicas ocorrem, incluindo um acúmulo de carboidratos solúveis, diminuição nos níveis de amido e acúmulo de compostos nitrogenados solúveis. Segundo Marschner (1995), parece que o K^+ não apenas ativa a nitrato redutase mas também é necessário para a síntese desta enzima. É possível relatar mudanças no metabolismo de carboidratos devido à grande necessidade de K^+ para certas enzimas reguladoras, particularmente piruvato-quinase (Miller & Evans, 1957; Tomlinson & Turner, 1973) e 6-fosfofrutoquinase (Läuchli & Pflüger, 1978). Elevadas concentrações de K^+ , entretanto, devem ter efeito inibitório (Preusser et al., 1981).

Outra função importante do K^+ é a ativação de ATPases ligadas à membrana, que requerem Mg^{2+} mas são estimuladas por K^+ e, em alguns casos, em um mesmo nível por Na^+ (Fisher & Hodges, 1969). A ativação de ATPases pelo K^+ não apenas facilita seu próprio transporte da solução externa através da membrana plasmática de células radiculares, mas também faz do K^+ o elemento mineral mais importante na extensão celular e na osmorregulação (Marschner, 1995).

Em plantas superiores, o K^+ afeta a fotossíntese em vários níveis. Seu papel na fixação de CO_2 pode ser demonstrado mais claramente com cloroplastos isolados. Aumento na concentração externa, para níveis semelhantes ao do citossol de células intactas, estimula a fixação de CO_2 mais de três vezes (Marschner, 1995).

Íons potássio são essenciais também para a integridade estrutural e portanto, pelas funções dos plastídeos. Aumento no conteúdo foliar de potássio é acompanhado de incremento nos níveis de fotossíntese e fotorrespiração e na atividade da RuBP carboxilase, acompanhada de diminuição na respiração noturna. Aumento dos níveis de respiração são características de deficiência de potássio (Bottrill et al., 1970). Parece que o K^+ desempenha outra função na fotossíntese, na regulação estomatal. O movimento do íon potássio é o fator principal na abertura e fechamento dos estômatos (Hopkins, 1995).

Em muitas espécies vegetais, o K^+ é o principal responsável pela mudança de turgor nas células guardas durante o movimento estomático. Aumento na concentração de K^+ nas células guardas resulta na absorção de água das células adjacentes e aumento correspondente no turgor das células guardas e portanto a abertura dos estômatos. O fechamento dos estômatos no escuro é correlacionado também com o efluxo de K^+ e correspondente decréscimo na pressão osmótica das células guardas. O ácido abscísico inibe a abertura estomática ou induz rápido fechamento dos estômatos (Mittelheuser & Van Steveninck, 1971). Este efeito do ABA é desencadeado principalmente pelo aumento na saída de K^+ das células guardas (MacRobbie, 1981). Um processo parecido com este, também envolvendo fluxo de K^+ , ocorre originando movimentos circadianos em determinadas plantas, como por exemplo *Mimosa pudica* (Toriyama & Jaffe, 1972), feijão (Kiyosawa, 1979) e *Albizia* (Satter et al., 1974). Segundo Felle (1991) íons cálcio têm um grande impacto na abertura de canais de K^+ , e inversamente também, K^+ externo influencia a entrada de Ca^{2+} e deve ainda controlar o fluxo deste.

A extensão celular em folhas está diretamente relacionada aos seus níveis de K^+ . Potássio e GA agem sinergisticamente, a maior taxa de alongação é obtida quando ambos K^+ e GA são aplicados. K^+ e açúcares redutores agem de forma complementar no desencadeamento de um potencial de turgor necessário para a extensão celular. Na deficiência de K^+ o crescimento é retardado e o K^+ é retranslocado de folhas maduras e hastes, e sob condições de deficiência severa estes órgãos podem se tornar cloróticos e necróticos (Bussler, 1964). A lignificação do feixe vascular é prejudicada (Pissarek,

1973), um fator que também deve ser responsável pela maior susceptibilidade de plantas deficientes em potássio ao acamamento.

Quando o suprimento de água no solo é limitante, a perda de turgor e a murcha são sintomas típicos da deficiência de potássio. Também os danos causados por geadas são inversamente relacionados com o conteúdo de potássio nas folhas. Durante abundância no suprimento de K^+ ocorre, frequentemente, um “consumo de luxo” de K^+ , que merece atenção por ambos seu efeito na composição da planta e pela sua possível interferência na absorção e na disponibilidade fisiológica de Ca^{2+} e Mg^{2+} (Marschner, 1995).

2.3- Importância da cultura de tecidos em plantas

As árvores lenhosas e semi-lenhosas possuem um ciclo vegetativo longo e grande variabilidade genética quando propagadas por sementes, o que induz incertezas na quantidade e qualidade dos compostos secundários produzidos. A micropropagação permite a produção de grande quantidade de mudas clonadas com características homogêneas e mesma capacidade genética de produção de metabólitos secundários que a planta matriz, sendo esta selecionada dentre as mais produtivas, permitindo assim a instalação de plantios comerciais promissores.

A técnica da cultura de tecidos se baseia na totipotencialidade das células vegetais, isto é, na capacidade das células das plantas se diferenciarem, formando plantas completas. Uma planta adulta é um sistema altamente diversificado, originário de uma única célula inicial que contém todas as informações genéticas. Apenas algumas células continuam a se dividirem na planta adulta, mas todas as outras ainda possuem esta capacidade de formarem novas plantas quando induzidas sob condições apropriadas, independentemente do grau de diferenciação que se encontram. Cada tipo de explante pode apresentar resposta morfológica diferente, exigindo certas condições para se desenvolverem *in vitro* (Augé, 1984). Alterações no balanço hormonal induzem a organogênese e embriogênese, direta ou indireta (através de calos).

Outra alternativa de produção é o cultivo de células em meio líquido que abre perspectivas do uso de plantas produtoras de metabólitos secundários para sintetizá-los nestas condições, criando expectativa na indústria farmacêutica para o uso deste campo da biotecnologia vegetal. O desenvolvimento destas técnicas e os estudos sobre as plantas produtoras de compostos secundários já permitem produção de alguns compostos em escala comercial, como fenóis, flavonóis, alcalóides, nicotina, e L-dopa (Staba, 1977). As células, mesmo indiferenciadas, ainda possuem a informação genética sobre a capacidade de síntese de compostos. Cultura de células em suspensão em biorreatores é, potencialmente, uma solução alternativa à obtenção de metabólitos secundários, sendo assim uma área de concentração de biotecnologia vegetal.

As culturas contínuas de células são instáveis e surgem variações somaclonais que afetam a produção de compostos, mas quando iniciam a diferenciação celular, as células produzem e acumulam compostos em quantidades semelhantes às encontradas nas plantas completas (Yeoman, 1987). As culturas de células *in vitro* apresentam várias vantagens em relação ao cultivo da planta inteira, destacando que não dependem das condições ambientais, uma vez que *in vitro* é possível controlar praticamente todos os fatores que possam exercer qualquer influência no desenvolvimento ou diferenciação de células e tecidos, podendo-se controlar também a produção de metabólitos através da adição de substratos específicos nas quantidades desejadas, permitindo melhor controle do processo de produção conforme a demanda da produtividade e da qualidade esperada do produto.

2.4- Nutrientes na cultura de tecidos

As culturas de células e tecidos, devido seu metabolismo e condições complexas de crescimento, exigem suprimento de nutrientes e de fatores de crescimento mais elaborado, podendo-se incluir, inclusive, substâncias artificiais (Aitchison *et al.*, 1977). Investigações baseadas em erros e acertos permitiram a Murashige & Skoog (1962) estabelecerem os meios básicos de cultivo de células vegetais *in vitro*. É razoável que se

tenha utilizado da mesma estratégia para se otimizar a composição dos meios de cultivo objetivando a maximização da produção de compostos metabólicos secundários.

Em todas as técnicas *in vitro*, a escolha apropriada dos componentes orgânicos e minerais determina o sucesso do método, uma vez que, para qualquer processo de crescimento ou de diferenciação celular, a necessidade específica é dependente da espécie estudada, da natureza do tecido e de seu estado fisiológico (Dussert et al., 1995a). Porém, são escassos os relatos sobre o efeito de nutrientes na embriogênese somática, mas íons como cálcio podem mediar muitas das respostas direcionadas pelos reguladores de crescimento em plantas (Guerra, 1989).

Explantos de *Panax ginseng* inoculados em meio de cultura sem fitorreguladores, porém com níveis elevados (três vezes a concentração normal) de sais (nitrato de amônio e de potássio, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e cloreto de cálcio), capazes de causar estresse e injúrias, promoveram a produção de embriões somáticos e calos embriogênicos (Choi et al., 1998).

2.4.1- Cálcio

Inúmeros têm sido os relatos da interferência de níveis de cálcio nas técnicas de cultivo *in vitro*, promovendo: diferenciação de xilema em cultura de células em suspensão (Roberts & Haigler, 1990), morfogênese de várias espécies vegetais, como *Micrasterias torreyi* Bail. (Lehtonen, 1984) e *Camellia japonica* L. (Pedroso & Pais, 1992), organogênese em raízes de *Pistacia atlantica* Desf. (Molina & Carreño, 1991), calogênese (Morard & Henry, 1998), androgênese em *Ioichroma warscewiczii* Regel (Canhoto et al., 1990), e embriogênese somática em *Daucus carota* (Jansen et al., 1990), em *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. (Etienne et al., 1997) e em *Eucalyptus urofilla*, além de aumentar neste, também o conteúdo de proteínas dos calos (Arruda, 2000).

O cálcio pode mediar respostas fisiológicas induzidas por auxinas (Allan & Hepler, 1989; Guerra, 1989) e citocinina (Allan & Hepler, 1989), sendo que para o último fitorregulador o Ca^{2+} acoplado à calmodulina, pode exercer tanto uma influência aditiva quanto de sinergismo (Elliott, 1983). Em algumas espécies de plantas o aumento

de CaCl_2 no meio resultou no aumento do potencial embriogenético (Ziv & Gadasi, 1986; Jansen *et al.*, 1990). Esses resultados são contrários ao constatado por Tabai (1992), quando trabalhando com macaúba, *Acromia aculeata* (Jack.) Loddiges, ao utilizar cálcio em concentrações igual ou superior ao meio de Murashige & Skoog (1962), seu efeito foi menos estimulador, apresentando melhor desenvolvimento nas concentrações menores de cálcio ($0,7 \cdot 10^{-3}$ e $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) que as originais do meio MS. Por outro lado, em palmeiras como o coco (*Cocos nucifera*), o aumento de cálcio, potássio e fósforo, estimulou o crescimento de calos. No entanto, o cálcio teve um efeito menos acentuado (Eeuwens, 1976). Em segmentos de folhas de *Graptopetalum paraguayense* (Hush *et al.*, 1991) e de *Camellia japonica* L. (Pedroso & Pais, 1992) a organogênese foi precedida por um fluxo de entrada de Ca^{2+} , levando os autores a concluírem que a absorção de Ca^{2+} é essencial como sinalização para a formação de calos, porém não sendo o único sinal de regulação deste processo, devendo existir também o envolvimento de outros cátions.

Morard & Henry (1998) ao estudarem a otimização da composição mineral de meios de cultura concluíram que, em geral, a calogênese decrescia com o aumento da concentração dos sais, sendo a concentração mais adequada para a calogênese metade da concentração dos sais da formulação de Murashige & Skoog (1962), porém nesta concentração o cálcio se tornava limitante. Ao se utilizar concentrações de cálcio bem maiores que de potássio a biomassa de calos duplicou, aumentando também a produção de metabólitos secundários (Morard & Henry, 1998).

Na embriogênese somática o cálcio apresenta efeitos diferentes dependendo das condições de cultivo *in vitro*. Em suspensão celular de cenoura (*Daucus carota*) baixas concentrações de Ca^{2+} afetam negativamente, enquanto que concentrações normais ou elevadas não alteram a embriogênese (Overvoorde & Grimes, 1994), porém quando o meio possui o fitorregulador 2,4-D, aumentando-se a concentração de cálcio a embriogênese é promovida (Jansen *et al.*, 1990). Em *Hevea Brasiliensis* Müll. Arg. baixos teores de cálcio levaram ao desenvolvimento de embriões somáticos (Montoro *et al.*, 1995), porém calos já mantidos em cultura por dois meses só apresentaram

desenvolvimento de embriões quando transferidos para meios com elevadas concentrações de cálcio acrescidos de BAP e de 3,4-D (Etienne et al., 1997).

Evidências sugerem que o processo de diferenciação celular depende da concentração de cálcio intracelular. Os fitorreguladores se ligam ao seu receptor na membrana, causando a ativação da fosfolipase C (PLC) que hidrolisará os fosfolipídeos fosfatidinositol-4,5 bifosfato (PIP) da membrana liberando inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). IP_3 se move até o vacúolo onde se liga aos receptores da membrana desta organela que ativam os transportadores de cálcio que liberam o cálcio do vacúolo para o citoplasma. O aumento da concentração de cálcio no citoplasma causa ativação de enzimas. Algumas são ativadas por Ca^{2+} livre e outras pelo complexo Ca-calmodulina, que será responsável pela fosforilação das enzimas, ativando ou desativando as mesmas, interferindo assim no processo de diferenciação celular (Davies, 1995).

2.4.2- Magnésio

Muito pouco tem sido estudado sobre os efeitos do magnésio na cultura de tecidos, porém, segundo Dussert et al. (1995b) e Magnaval et al. (1997) existem evidências que apontam para a importância do Mg^{2+} na indução da embriogênese somática em *Cocos nucifera* L. A ocorrência de embriogênese é antecedida por síntese de proteínas, principalmente das chamadas “Late embryogenesis abundant proteins” (LEA). O magnésio, uma vez funcionando como elemento ponte para a agregação de subunidades de ribossomos, sendo necessário para a RNA polimerase e promovendo a formação de RNA no núcleo, indica ter essencial importância para a ocorrência da síntese de proteínas. Com as múltiplas funções do Ca^{2+} e do Mg^{2+} nos sistemas enzimáticos, é possível que a iniciação da embriogênese esteja associada com necessidades específicas desses dois cátions (Dussert et al., 1995b).

He et al. (1989), ao estudarem o efeito de macronutrientes na indução de embriogênese de calos obtidos a partir de embriões imaturos de trigo (*Triticum aestivum* L.) observaram menor calogênese e maior retenção de água nos calos de explantes induzidos em meio de cultura contendo baixas concentrações de magnésio.

Outra citação para o magnésio seria o seu efeito inibitório juntamente com o dos íons cálcio, cobalto e cobre na produção de metabólitos secundários (sapogeno esteróides) em calos cultivados de *Agave amaniensis* (Andrijany et al., 1999).

2.4.3- Potássio

Existem vários trabalhos citando o K^+ como promotor de embriogênese somática, porém na maior parte deles, esta promoção é considerada efeito do estresse causado pelas altas concentrações de sais, como ocorre com *Panax ginseng* (Choi et al., 1998).

Já em *Hybanthus enneaspermus* L. Muell. a adição suplementar de fosfato de potássio em meio de cultura promoveu diferenciação de gemas vegetativas em calos (Prakash et al., 1999). Também em explantes de *Camellia japonica* L. foram detectados através de microscopia eletrônica, elevados níveis de potássio, cálcio, sódio, ferro e enxofre em células do parênquima durante a morfogênese direta, os quais diminuíram após o estabelecimento da morfogênese (Pedroso & Pais, 1992).

Rathore et al. (1988) acreditam na possibilidade de que o campo elétrico estabelecido em embriões somáticos resulta em transporte polar de ácido indolil acético que, em parte, deve controlar o desenvolvimento embriogênico. Ao estudarem correntes iônicas em embriões somáticos de cenoura concluíram que o K^+ é o componente principal destas correntes, uma vez que suprimido dos meios de cultura as correntes diminuíam substancialmente.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Obtenção de plantas matrizes com diferentes estados nutricionais

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) do Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), no Campus da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP.

As sementes da unha-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link), foram fornecidas pelo Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP em Piracicaba, a partir das quais foram formadas mudas que serviram como matrizes para este projeto.

A semeadura foi realizada em casa de vegetação em vasos de plástico com 1L de capacidade usando como substrato areia de granulometria média, adequadamente lavada. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e regados com água até o murchamento das folhas cotiledonares. Após esse período, as plantas passaram a ser irrigadas com solução nutritiva contendo diferentes níveis: ¼X, ½X, 1X, 2X e 3X da concentração da solução nutritiva ideal em cálcio (200g.L⁻¹), magnésio (48g.L⁻¹) e potássio (234g.L⁻¹), conforme mostra a Tabela 1.

As doses dos nutrientes foram testadas em dezoito vasos por tratamento contendo quatro plantas por vaso. As soluções nutritivas (tabela 2) foram preparadas segundo recomendações de Sarruge (1975) e continham os nutrientes testados em concentrações supostamente capazes de causar deficiência (Tratamentos 2, 3, 6, 7, 10 e 11), nutrição normal (Tratamento 1) e toxidez (Tratamentos 4, 5, 8, 9, 12 e 13) nutricional nas matrizes.

As plantas, sempre mantidas em casa de vegetação, receberam 100 mL de solução nutritiva, por vaso, de três a quatro vezes por semana, dependendo da temperatura e umidade local.

Tabela 1- Tratamento nutricional em Ca, Mg e K realizados em matrizes de *B. forficata* e número de amostras coletadas e inoculadas no longo dos tratamentos (15, 30, 45 e 60 dias após início da aplicação das soluções nutritivas contendo diferentes níveis dos nutrientes).

TRATAMENTOS		Duração do Tratamento (dias)			
		15	30	45	60
1	Testemunha (completo)	18	18	18	18
2	$\frac{1}{4}$ X Ca (50g Ca^{2+} . L ⁻¹)	18	18	18	18
3	$\frac{1}{2}$ X Ca (100g Ca^{2+} . L ⁻¹)	18	18	18	18
4	2X Ca (400g Ca^{2+} . L ⁻¹)	18	18	18	18
5	3X Ca (600g Ca^{2+} . L ⁻¹)	18	18	18	18
6	$\frac{1}{4}$ X Mg (12g Mg^{2+} . L ⁻¹)	18	18	18	18
7	$\frac{1}{2}$ X Mg (24g Mg^{2+} . L ⁻¹)	18	18	18	18
8	2X Mg (96g Mg^{2+} . L ⁻¹)	18	18	18	18
9	3X Mg (144g Mg^{2+} . L ⁻¹)	18	18	18	18
10	$\frac{1}{4}$ X K (58,5g K^{+} . L ⁻¹)	18	18	18	18
11	$\frac{1}{2}$ X K (117g K^{+} . L ⁻¹)	18	18	18	18
12	2X K (468g K^{+} . L ⁻¹)	18	18	18	18
13	3X K (702g K^{+} . L ⁻¹)	18	18	18	18

Após início do tratamento com soluções nutritivas, a cada quinze dias, dezoito plantas de cada tratamento foram coletadas, lavadas, desinfestadas e segmentadas para

Tabela 2- Composição química das diferentes soluções nutritivas (mL.L⁻¹) adaptado de Sarruge (1975), aplicadas às plantas matrizes de *B. forficata* para testar o efeito nutricional em Ca, Mg e K na calogênese.

TRATAMENTOS													
Soluções	Test.	Cálcio (g.L ⁻¹)			Magnésio (g.L ⁻¹)			Potássio (g.L ⁻¹)					
		¼ x	½ x	2 x	3 x	¼ x	½ x	2 x	3 x	¼ x	½ x	2 x	3 x
de nutrientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
KH ₂ PO ₄ M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KNO ₃ M	5	5	5	5	5	5	5	1	5	0,5	2	5	5
Ca(NO ₃) ₂ M	5	1,25	2,5	5	5	3,5	4	5	1	5	5	5	5
MgSO ₄ M	2	2	2	2	2	0,5	1	2	2	2	2	2	2
KCl M	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	6	12
CaCl ₂ M	-	-	-	5	10	1,5	1	-	4	-	-	-	-
NH ₄ H ₂ PO ₄ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NH ₄ NO ₃ M	-	3,75	2,5	-	-	-	-	-	-	2,25	1,5	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ M	-	-	-	-	-	1,5	1	-	-	-	-	-	-
Mg(NO ₃) ₂ M	-	-	-	-	-	-	-	2	4	-	-	-	-
Micro*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fe - EDTA**	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P.O. (atm)	0,8189	0,656	0,617	0,909	1,278	0,658	0,618	0,687	1,056	0,429	0,466	0,835	1,131

* 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 N e 24,0g de FeSO₄ . 7H₂O, arejando-se por doze horas de escuro e completando-se o volume a 1 litro.

servirem como explantes. No momento da coleta dos explantes (entre-nós) foram retiradas todas as folhas da planta, obtendo-se massa de matéria fresca foliar total de cada uma, em seguida estas folhas foram secas em estufa a 70°C por sete dias, sendo feito também a determinação da massa de matéria seca.

3.2- Estabelecimento da cultura de calos

Como explantes, foram utilizados segmentos de caule sem gema axilar (entre-nós) entre terceiras e quartas folhas a partir do ápice das plantinhas.

O método de assepsia adotado após alguns ensaios preliminares constituiu em mergulhar os explantes (segmentos de caule das plantas), assim que coletados, imediatamente em solução de etanol 70% (v/v) por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, os segmentos foram levados para a mesa de fluxo laminar e colocados em frascos contendo solução de hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) acrescido de três gotas de Tween (detergente neutro) por aproximadamente 20 minutos. Finalmente os explantes foram lavados 3 vezes em água deionizada autoclavada e segmentados para aproximadamente 1cm de comprimento, sendo desprezadas a extremidades que estiveram em contato com as soluções de desinfestação.

Os explantes foram inoculados em meio de cultura (tabela 3) contendo concentração de sais e vitaminas da formulação de Murashige & Skoog (1962) acrescido de 3 mg da citocinina BAP (Benzilaminopurina), 30g de sacarose e 2,3g de Phytigel (Sigma) por litro de meio. As concentrações e o tipo de regulador de crescimento utilizados foram anteriormente testados, buscando estabelecer um meio de cultura capaz de, inicialmente, induzir rápida calogênese e posteriormente, induzir a morfogênese.

Os frascos contendo os explantes em meio de cultura foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e temperatura de 25±2°C.

O pH final dos meios foi ajustado para 5,75±0,05 com solução de HCl (1N) ou KOH (1N). A esterilização foi realizada em autoclave à temperatura de 120°C e pressão de 1atm por 30 minutos.

Tabela 3- Composição do meio de cultura utilizado na indução de calogênese em explantes de *B. forficata*, segundo formulação de Murashige & Skoog (1962).

Componentes	Concentração (mg/L)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	37,3
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,3
MnSO ₄ . 4H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,026
Vitaminas	
Ác. Nicotínico	0,5
Piridoxina . HCl	0,5
Tiamina	0,1
Glicina	2,0
Mio-inositol	100
BAP	3
Sacarose	30000
Phytigel (Sigma)	2300

Para a avaliação da calogênese, foi feito a pesagem de todos os explantes antes de serem inoculados e dos calos a cada vinte e oito dias, momento em que eram efetuadas as transferências dos calos para novos meios de cultura, porém com a mesma composição (tabela 3). Entendemos que subtrair a massa dos explantes da massa dos respectivos calos não seria correto para expressar o desenvolvimento dos calos. Adotamos então, uma

medida que chamamos de índice de multiplicação da massa de matéria fresca dos calos, onde a massa de cada calo foi dividida pela massa de seu explante.

Também a cada 28 dias, 5 calos de cada tratamento foram coletados após sua pesagem e levados para estufa a 70°C por sete dias, determinou-se então a massa de matéria seca dos calos e posteriormente seu teor de proteínas.

3.3- Análise da concentração protéica nos calos

Os extratos foram obtidos através da maceração de calos (secos em estufa a 70°C por 7 dias) em nitrogênio líquido e acrescido de 1mL de solução tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,0 para cada 30mg de massa de matéria seca de calo.

O teor de proteína dos extratos foi determinado com base no método descrito por Bradford (1976), onde 10µL de extrato das amostras foram adicionados a 990µL do reagente de Bradford (em 50mg de Comasie Brilliant Blue G-250 dissolvido em 25mL de etanol adiciona-se 50mL de ácido fosfórico 85% a qual é em seguida adicionada em 425mL de água e filtrada a vácuo) e deixados para reagir por 10 minutos. Após a reação, foi efetuado a leitura da densidade ótica a 595nm. A concentração protéica das amostras foi feita, tomando-se como base uma reta padrão construída com BSA (soro albumina bovina) nas concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10; e 15µg.mL⁻¹.

3.4- Análise Estatística

Utilizando-se do sistema para análise estatística SAS, foi realizada a análise da variância e de regressão, no delineamento inteiramente ao acaso, com 18 repetições para massas de folhas frescas e secas, 14 para massa de matéria fresca de calos, 5 para massa de matéria seca de calos e 18 para teor de proteínas. Foram utilizadas as transformações, logaritmo para gramas de folhas frescas e para índice de multiplicação de calos frescos, $x^{0,4}$ para gramas de folhas secas e de calos secos e $x^{0,3}$ para microgramas de proteína por

miligrama de massa de matéria seca de calo. As comparações de médias foram feitas através de teste Tukey a 5% de probabilidade.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Desenvolvimento das Plantas Matrizes

Trinta dias após a germinação das sementes ocorreu a murcha das folhas cotiledonares, sendo então iniciado a irrigação das plantas com as soluções nutritivas apropriadas (tabelas 1 e 2).

Trabalhos preliminares em plantas de *B. forficata* indicaram que os sintomas de deficiência de cálcio demoram mais que o previsto para se manifestarem (60 dias de tratamento). A manifestação dos sintomas de deficiência de outros nutrientes, em geral nunca ultrapassam os trinta dias de tratamento para espécie anuais, porém em se tratando de espécie perene este período pode ser mais longo. Como o objetivo do presente trabalho não é obter nem estudar os sintomas visuais de deficiências nas plantas, as coletas de explantes foram realizadas no período de 15 a 60 dias de tratamento. No decorrer deste tempo não foi observado nenhum dos sintomas típicos visuais de deficiência nas partes aéreas das plantas para nenhum dos nutrientes testados.

Os resultados da média de massa de matéria fresca das folhas das plantas sob tratamentos (figuras 1, 2 e 3) mostraram ausência de diferença significativa entre níveis ($\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$, $3X$) para cada nutriente. Entre nutrientes (Ca, Mg, K), foi significativo apenas em relação à duração de tratamento das plantas. Foi observado aumento da massa com a duração dos tratamentos (15, 30, 45, 60 dias) para todos os nutrientes (figura 1). A linha de tendência das médias em relação aos níveis dos nutrientes indica que houve uma tendência de constância na produção de massa ao se elevar os

Figura 1- Efeito do tratamento de plantas matrizes de *B. forficata* com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, 1X, 2X e 3X da concentração do nutriente cálcio presente na solução nutritiva de Sarruge (1975), ao longo de 60 dias de tratamento, no teor de massa fresca (A) e seca (B) foliar das plantas (g/planta).

Figura 2- Efeito do tratamento de plantas matrizes de *B. forficata* com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente magnésio presente na solução nutritiva de Sarruge (1975), ao longo de 60 dias de tratamento, no teor de massa fresca (A) e seca (B) foliar das plantas (g/planta).

Figura 3- Efeito do tratamento de plantas matrizes de *B. forficata* com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente potássio presente na solução nutritiva de Sarruge (1975), ao longo de 60 dias de tratamento, no teor de massa de matérias fresca (A) e seca (B) foliar das plantas (g/planta).

níveis de cálcio das soluções nutritivas dentro das concentrações testadas, porém aumentando-se os níveis de magnésio e de potássio a tendência foi de queda da massa foliar, mas sendo significativo apenas a regressão linear do potássio.

De acordo com Vesik et al. (1966) plantas deficientes em magnésio devem sofrer acúmulo de amido e portanto de biomassa, porém para plantas de *B. forficata* este aumento não foi observado no período e dentro dos níveis de nutrientes estudados. Além disto, em plantas deficientes em potássio, nas quais deve ocorrer diminuição dos níveis de amido (Marschner, 1995), os resultados mostraram massa foliar relativamente maior. Como o período de tratamento para a *B. forficata* não foi longo o suficiente para o aparecimento dos sintomas, certamente também não o foi para a manifestação total dos sintomas fisiológicos de deficiência. Isto corresponde plenamente aos nossos objetivos que eram os de investigar calogênese em planta, fisiologicamente e não morfolologicamente deficiente.

Em relação à duração do tratamento, a massa de matérias fresca e seca foliar foi crescente, o que já era previsto, visto que independente de tipo de tratamento, a planta está crescendo e aumentando o número e massa de folhas. Porém, ao se comparar massa de matéria fresca e massa de matéria seca foliares, pode-se notar que existe diferença de retenção de água para os diferentes níveis de nutrientes. Para o nutriente cálcio, houve uma tendência igual de retenção de água para os diferentes níveis do nutriente, exceto para massa foliar de plantas tratadas com 2X Ca por 15 dias, que apresentaram maior retenção de água (figura 1). Para os nutrientes magnésio (figura 2) e potássio (figura 3), pode-se notar, principalmente após 60 dias de tratamento que quanto maior o estresse, provocado tanto por concentrações baixas quanto por concentrações elevadas dos nutrientes, maior foi a retenção de água das folhas.

4.2- Calogênese

Os resultados obtidos para o efeito dos tratamentos de matrizes de *B. forficata* com diferentes níveis de Ca, Mg e K durante variáveis períodos de tempo na calogênese

são apresentados nas figuras 4, 6 e 8 (massa de matéria fresca) e nas figuras 5, 7 e 9 (massa de matéria seca).

O tratamento testemunha, que contém solução nutritiva completa apresentou diferença significativa entre médias, para duração dos tratamentos das plantas com soluções nutritivas bem como entre médias para período de tempo de cultivo *in vitro*. As diferenças entre médias para calos frescos e secos foram significativas para todos os períodos de tempo *in vitro*, entretanto somente as médias de massa fresca de calos provenientes de plantas tratadas por 15 dias foram significativamente diferentes das médias de calos de plantas tratadas por 30, 45 e 60 dias, para todos os tratamentos com soluções nutritivas.

Em relação ao comportamento geral de produção de calos pelos explantes de todos os tratamentos, houve tendência de diminuir a indução ou crescimento dos calos em termo de matéria fresca (figuras 4, 6 e 8) e de aumentar a massa de matéria seca dos calos (figuras 5, 7 e 9) com o aumento do tempo de tratamento das plantas com soluções nutritivas. Estes resultados indicam que houve menor retenção de água em calos provenientes de explantes de plantas deficientes ou com elevados teores dos nutrientes tratadas por 60 dias. A idade dos calos não parece alterar o perfil da massa de matérias fresca e seca produzida pelos explantes em todos os tratamentos.

Maiores teores de massa de matéria fresca e menores de matéria seca foram sempre observados nos explantes provenientes dos primeiros 15 dias de tratamento para todos os níveis de todos os nutrientes empregados. Como este período de coleta de explantes foi subsequente ao tempo de 30 dias iniciais de irrigação apenas com água destilada, é possível que este comportamento seja consequência do estresse nutricional estabelecido nas plantas antes do início dos tratamentos. Também, certamente este efeito desaparece com o passar do tempo de aplicação das soluções nutritivas, passando então a apresentar os efeitos da deficiência ou toxidez dos nutrientes testados.

Conforme pode ser observado nas figuras 4 a 9, a indução de calos frescos e secos parece ser semelhante para os níveis correspondentes entre os nutrientes, existindo maiores diferenças entre diferentes níveis do mesmo nutriente. Entretanto podemos

apontar algumas diferenças significativas que ocorreram entre médias de um mesmo nível de diferentes nutrientes. A avaliação feita após 28 dias *in vitro* apontou média de massa de matéria fresca de calos provenientes de plantas tratadas com 2X Ca, menores que os de plantas tratadas com 2X K por 30 dias. O mesmo comportamento foi notado para calos obtidos de explantes de plantas tratadas com $\frac{1}{2}$ X Mg em relação a $\frac{1}{2}$ X K também por 30 dias e após 28 dias de inoculação.

Após 15 dias de tratamento com soluções nutritivas, a média da massa de calos frescos provenientes de plantas tratadas com 3X Ca foi maior que 3X K, porém 2X Ca foi menor que 2X K, na avaliação feita após 56 dias de inoculação. Durante a mesma avaliação, porém de calos obtidos a partir de explantes de plantas tratadas por 45 dias com soluções nutritivas contendo 2X Ca ou 2X K, resultaram em médias de massa de matéria fresca menores que a média da massa de calos provenientes de plantas tratadas com 2X Mg. Em relação à média de massa de matéria seca de calos, apenas as plantas tratadas por 45 dias com 2X K resultaram em massa de calos menores que os calos de plantas tratadas com 2X Mg, também na avaliação feita aos 56 dias *in vitro*.

Os contrastes de médias da testemunha com todos os nutrientes foi significativo, assim como o contraste de todos os níveis de cálcio com todos os níveis de magnésio e de potássio, indicando que existe diferença na calogênese (calos frescos) para este nutrientes e confirmando o citado acima.

4.2.1- Cálcio

O efeito dos diferentes níveis de cálcio na calogênese, expresso em massa de matérias fresca e seca de calos são apresentados nas figuras 4 e 5, respectivamente. Os resultados mostram que explantes extraídos de plantas tratadas com solução nutritiva contendo baixos teores de cálcio produzem menos calos. A massa fresca dos calos foi inversamente proporcional ao teor de cálcio na solução nutritiva e ao tempo de tratamento. Por outro lado, relação diretamente proporcional para tempo de tratamento foi observado para a produção de massa de matéria seca de calos. Estes resultados indicam portanto efeito do cálcio na retenção de água pelas células dos calos.

Com 15 dias de tratamento, as médias de massa fresca dos calos do tratamento testemunha e do tratamento com $\frac{1}{4}X$ Ca foram significativamente maiores que do tratamento contendo o dobro da concentração de cálcio para 28 e 56 dias *in vitro*. Isto, como discutido acima, pode refletir o efeito do estresse nutricional em cálcio causado pelo tempo em que as plantas foram irrigadas somente com água no início do experimento.

Com 45 dias de tratamento, as médias de calos frescos dos tratamentos $\frac{1}{4}X$ e $\frac{1}{2}X$, foram significativamente maiores que do tratamento contendo $2X$ Ca para avaliação feita aos 56 dias *in vitro* (figura 4). O tempo *in vitro* das culturas causou somente maior acúmulo de matéria fresca e seca, não alterando portanto o perfil da calogênese observada. Em relação às médias de calos secos, as diferenças obtidas não foram significativas (figura 5)

Para calos frescos a regressão linear do cálcio foi significativa, permanecendo constante ou tendendo a cair a multiplicação de massa com o aumento da concentração de cálcio.

O comportamento da indução de calogênese expressa em produção de massa de matéria seca, tendendo a apresentar menor massa quando os explantes foram retirados de plantas tratadas com níveis elevados de cálcio (figura 5) contradiz os resultados encontrados por Eeuwens (1976) e Josekutty (1998) que observaram estímulo no crescimento de calos com o aumento do teor de cálcio, ao trabalharem com palmeiras e com *Impatiens flanaganiae*. Porém, o comportamento de explantes de *B. forficata* tratadas em concentrações elevadas de cálcio pode ser reforçado com os resultados encontrados por Tabai (1992), que ao trabalhar com macaúba, notou efeito menos estimulador da calogênese ao utilizar cálcio em concentrações igual ou superior ao meio de Murashige & Skoog (1962), da mesma forma, He et al. (1989) observaram menor teor de calogênese em explantes de trigo inoculados em meio contendo elevadas concentrações de $CaCl_2$ e Morard & Henry (1998) concluíram que a calogênese decresce com o aumento da concentração de sais, porém em baixas concentrações, o cálcio se torna limitante sendo necessário sua aplicação em concentrações elevadas.

Figura 4- Efeito do tratamento de plantas matrizes de *B. forficata* com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente cálcio presente na solução nutritiva de Sarruge (1975), ao longo de 60 dias de tratamento, no teor de massa de matéria fresca de calos. Avaliações feitas aos 28 (A) e 56 (B) dias *in vitro*.

Figura 5- Efeito do tratamento de plantas matrizes de *B. forficata* com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente cálcio presente na solução nutritiva de Sarruge (1975), ao longo de 60 dias de tratamento, no teor de massa de matéria seca de calos (g/cal). Avaliações feitas aos 28 (A) e 56 (B) dias *in vitro*.

Trabalhos que considerem o efeito do estado nutricional de plantas matrizes (tratamentos em vasos) na calogênese não foram encontrados e as comparações com outros trabalhos que utilizaram os tratamentos *in vitro* não podem ser empregadas como subsídios para discussão.

4.2.2- Magnésio

O efeito do tratamento com diferentes níveis de magnésio na calogênese são mostrados nas figuras 6 (massa de matéria fresca de calos) e 7 (massa de matéria seca de calos). Os resultados indicam que explantes extraídos de plantas tratadas com soluções nutritivas contendo níveis de magnésio maiores ou menores que o tratamento testemunha, apresentaram, no geral, menor calogênese quando comparados com calos provenientes de explantes de plantas tratadas com a solução nutritiva completa.

Plantas com 15 dias de tratamento em soluções nutritivas contendo a metade, 2 e 3 vezes a concentração da testemunha resultaram em massa de calos frescos significativamente menores que calos das plantas testemunhas na avaliação feita aos 28 dias *in vitro*, permanecendo assim na avaliação feita aos 56 dias *in vitro*. Em relação a calos secos não houveram diferenças significativas entre médias.

Em relação à duração dos tratamentos, a massa de matéria fresca dos calos foi inversamente proporcional ao tempo de tratamento, enquanto que a massa de matéria seca de calos comportou-se de maneira diretamente proporcional para todos os tratamentos, porém em menor intensidade para o tratamento testemunha, significando que ocorreu menor retenção de água em calos provenientes de explantes de plantas tratadas durante 60 dias com soluções nutritivas. Considerando que a duração do tratamento permite a recomposição do teor de magnésio na planta e que as plantas foram submetidas a tratamento somente com água destilada por 30 dias, o efeito acentuado aos 15 dias de tratamento pode estar apenas refletindo o estresse nutricional o qual levou tempo mais longo para ser aliviado nos tratamentos com menores níveis de nutrientes.

Figura 6- Efeito do tratamento de plantas matrizes de *B. forficata* com 1/4X, 1/2X, 1X, 2X e 3X da concentração do nutriente magnésio presente na solução nutritiva de Sarruge (1975), ao longo de 60 dias de tratamento, no teor de massa de matéria fresca de calos. Avaliações feitas aos 28 (A) e 56 (B) dias *in vitro*.

Figura 7- Efeito do tratamento de plantas matrizes de *B. forficata* com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente magnésio presente na solução nutritiva de Sarruge (1975), ao longo de 60 dias de tratamento, no teor de massa de matéria seca de calos (g/calor). Avaliações feitas aos 28 (A) e 56 (B) dias *in vitro*.

A regressão linear foi significativa para magnésio apenas para a massa de matéria fresca de calos, tendendo sempre a indicar um comportamento constante ou de queda de massa em relação ao aumento nos níveis de magnésio das soluções nutritivas, o que contradiz os resultados encontrados por He et al. (1989) que observaram, ao trabalharem com embriões imaturos de trigo, uma relação direta entre níveis de magnésio no meio de cultura e calogênese. Embora não significativo, aos 28 e 56 dias *in vitro*, calos secos apresentaram uma tendência de acúmulo de massa com o aumento da concentração de magnésio (figura 7).

4.2.3- Potássio

O efeito do tratamento com diferentes níveis de potássio na calogênese são apresentados nas figuras 8 (massa de matérias fresca de calos) e 9 (massa de matéria seca de calos). Em geral, plantas com 15 dias de tratamento em soluções nutritivas, tanto com baixo como com alto teor de potássio, resultaram em calos frescos com menor massa comparados com plantas tratadas com a solução testemunha, porém apresentaram diferença significativa, somente os calos provenientes de plantas tratadas com $\frac{1}{2}X$ e $3X$ K na avaliação feita aos 28 dias; e em relação a $\frac{1}{2}X$, $2X$ e $3X$ K na avaliação feita após 56 dias *in vitro*. Também a média da massa de calos frescos obtidos de explantes de plantas tratadas com $\frac{1}{4}X$ K foi significativamente maior que dos calos de plantas tratadas com $\frac{1}{2}X$ e $3X$ K na avaliação feita aos 56 dias *in vitro*.

Plantas tratadas por 30 dias com $\frac{1}{4}X$ K resultaram em massa de calos frescos significativamente maiores que os de plantas tratadas com $\frac{1}{2}X$ K, e este, por sua vez apresentou massa de matéria fresca de calos maior que de calos provenientes de plantas tratadas com $2X$ K. Depois de 45 dias de tratamento das plantas com $3X$ K, pôde-se obter massa de calos maiores que dos de plantas tratadas com $2X$ K na avaliação feita aos 56 dias *in vitro*.

Em relação às médias de massa de matéria seca de calos obtidos a partir de plantas tratadas por 45 dias com o dobro da concentração ideal de potássio foram significativamente menores que as médias de massa de matéria seca de calos provenientes

Figura 8- Efeito do tratamento de plantas matrizes de *B. forficata* com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente potássio presente na solução nutritiva de Sarruge (1975), ao longo de 60 dias de tratamento, no teor de massa de matéria fresca de calos. Avaliações feitas aos 28 (A) e 56 (B) dias *in vitro*.

Figura 9- Efeito do tratamento de plantas matrizes de *B. forficata* com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente potássio presente na solução nutritiva de Sarruge (1975), ao longo de 60 dias de tratamento, no teor de massa de matéria seca de calos (g/calor). Avaliações feitas aos 28 (A) e 56 (B) dias *in vitro*.

de plantas tratadas com os tratamentos testemunha e $\frac{1}{2}X$ K na avaliação dos 56 dias *in vitro*, o mesmo aconteceu, na mesma avaliação, com a média de calos das plantas tratadas com o triplo da concentração ideal em relação aos calos obtidos de explantes de plantas tratadas com a solução testemunha. Plantas tratadas por 15 dias com $\frac{1}{2}X$ K originaram calos menores que os de plantas testemunhas em ambas avaliações (28 e 56 dias *in vitro*)

A regressão linear mostrou-se significativa para os níveis de potássio, tanto para massa de matéria fresca quanto seca de calos. Assim como ocorreu com cálcio e magnésio, a tendência observada para os resultados das figuras 8 e 9 é a de menor crescimento de calos para concentrações elevadas de potássio. Porém não significa, necessariamente, que explantes de plantas tratadas com níveis elevados de nutrientes sejam indesejáveis na cultura de tecidos de plantas, já que pode ocorrer maior índice de diferenciação em calos que se desenvolvem menos (He et al., 1989). De acordo com Brown et al. (1976) o crescimento de células de cenoura *in vitro* é promovido por concentrações de potássio menores que as necessárias para a ocorrência de embriogênese. Níveis elevados de Potássio embora não promovam máximo crescimento, promovem maior embriogênese em cenoura (Brown et al., 1976) e em trigo (He et al., 1989).

4.3- Teor de Proteínas nos Calos

O efeito do tratamento de plantas matrizes com diferentes níveis de cálcio, magnésio e potássio na concentração protéica de calos são apresentados nas figuras 10, 11 e 12. Os resultados indicam que o acúmulo de proteínas nos calos mantidos em crescimento por períodos de tempo mais longo está relacionado com a ocorrência de diferenciação celular (resultados não mostrados). A avaliação preliminar da diferenciação mostrou alta taxa de início do processo de diferenciação nos calos mantidos em cultivo por períodos acima de 50 dias, ocorrendo uma tendência de acúmulo de proteínas após 56 dias de crescimento *in vitro*, em relação a calos mantidos em cultura por 28 dias,

quando as plantas matrizes foram tratadas por 15 ou 30 dias. Entretanto, quando tratadas por 45 dias ou mais, os calos apresentaram mais proteínas aos 28 dias *in vitro*.

Segundo Dussert et al. (1995b), a ativação da síntese de proteínas precede a diferenciação celular. Plantas que passaram por um período maior em condições de deficiência ou toxidez dos nutrientes, provavelmente se encontram mais estressadas, o que pode promover a diferenciação celular (Choi et al., 1998).

O contraste entre testemunha e tratamentos foi significativo, assim como o tratamento com potássio em relação a cálcio e magnésio, ou seja, plantas tratadas com a solução nutritiva completa ou com níveis mais elevados de potássio (2X e 3X) por 15, 30, 45 ou 60 dias originaram calos com teores de proteínas significativamente maiores que os cultivados nos níveis correspondentes de cálcio ou magnésio em ambas avaliações feitas após 28 e 56 dias *in vitro*.

Explantos de matrizes tratadas por até 45 dias com níveis baixos de cálcio ($\frac{1}{4}X$ e $\frac{1}{2}X$) produziram calos com teores protéicos significativamente maiores que os calos provenientes de explantes de plantas tratadas com os níveis correspondentes de magnésio e potássio.

4.3.1- Cálcio

O efeito do tratamento de plantas matrizes com diferentes teores de cálcio na síntese de proteínas em calos está apresentado na figura 10. Os resultados indicam que com o aumento dos níveis de cálcio nas soluções nutritivas ocorre queda significativa do teor protéico dos calos. Esta queda de teor de proteína com o aumento da concentração de cálcio pode ser resultante do efeito inibitório do Ca^{2+} sobre enzimas, conforme citado por Baier & Latzko (1976), Miller & Evans (1957) e Tomlinson & Turner (1973). Além disso, elevados níveis de cálcio podem inibir absorção de Mg^{2+} (Heenan & Campbell, 1981), íon que, em plantas, tem sua função relacionada à síntese protéica e ativação enzimática (Marschner, 1995). Como Ca^{2+} e Mg^{2+} são cátions divalentes, o Ca^{2+} pode

Figura 10- Efeito do tratamento de plantas matrizes de *B. forficata* com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente cálcio presente na solução nutritiva de Sarruge (1975), ao longo de 60 dias no teor de proteína de calos secos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MMS calo). Avaliações feitas aos 28 (A) e 56 (B) dias *in vitro*.

competir por sítios de ligação com Mg^{2-} , inativando ou ativando descontroladamente certas enzimas (McLaughlin & Wimmer, 1999).

Plantas tratadas com níveis normais e baixos de cálcio (1X Ca, $\frac{1}{4}$ X Ca e $\frac{1}{2}$ X Ca) produziram calos com teores significativamente mais elevados de proteína ao longo de toda a duração do tratamento. A idade dos calos não afetou o perfil protéico apresentado pelo tratamento com cálcio, sendo observado apenas maior acúmulo de proteína. Também ficou aparente o efeito negativo da duração do tratamento no teor de proteína dos calos, principalmente para aquelas com alto teor de cálcio.

4.3.2- Magnésio

Os resultados para o efeito do tratamento com magnésio (figura 11) mostrou que tanto explantes provenientes de plantas tratadas com baixos níveis ($\frac{1}{4}$ X e $\frac{1}{2}$ X), como com altos níveis de magnésio (2X e 3X), com relação à solução nutritiva completa, produziram calos com teores de proteína significativamente menores. A duração do tratamento não afetou significativamente o teor de proteína dos calos para cada um dos diferentes níveis de magnésio.

O efeito dos baixos níveis de magnésio no teor de proteína está certamente relacionado com a participação do magnésio na agregação de subunidades de ribossomos (Cammarano et al., 1972), já que quando os níveis de magnésio são deficientes as subunidades se desassociam e a síntese protéica cessa (Sperrazza & Spremulli, 1983).

Entretanto o efeito negativo dos altos teores de magnésio no teor de proteínas de calos parece não ter explicação fisiológica, já que em maiores níveis de magnésio deveria ter ocorrido maior síntese de proteínas, mesmo porque, antes de começarem a receber as irrigações com as soluções nutritivas as plantas passaram por período recebendo apenas água, o que deve ter promovido estresse nutricional nas plantas, e este deveria ter sido vencido primeiramente pelas plantas tratadas com as concentrações mais altas dos nutrientes.

Figura 11- Efeito do tratamento de plantas matrizes de *B. forficata* com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente magnésio presente na solução nutritiva de Sarruge (1975), ao longo de 60 dias no teor de proteína de calos secos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MMS calo). Avaliações feitas aos 28 (A) e 56 (B) dias *in vitro*.

Os teores de proteína dos calos com 28 e 56 dias mostraram que a idade dos calos não afetou o perfil protéico dos mesmos, sendo observado apenas o aumento do acúmulo protéico. Este maior acúmulo de proteína para calos mantidos por tempo mais longo *in vitro* pode estar associado à alta taxa de diferenciação celular observada (resultados não mostrados) nestes calos, já que ocorre síntese de proteínas específicas em células vegetais submetidas a diferenciação celular (MagnaVal et al., 1997).

4.3.3- Potássio

O efeito do tratamento de plantas matrizes com diferentes níveis de potássio, apresentado na figura 12, indica que, no geral, a síntese de proteínas em calos tende a ser diretamente proporcional ao teor de potássio contido na solução nutritiva.

Explantos de plantas tratadas por 15 dias com solução nutritiva contendo $\frac{1}{4}X$ K deram origem a calos com teor protéico significativamente menores que calos provenientes de plantas tratadas com os demais níveis do nutriente, em ambas avaliações, após 28 e 56 dias *in vitro*. Obedecendo a relação diretamente proporcional entre teor de potássio e teor de proteínas nos calos, explantes de plantas tratadas por 45 ou 60 dias com solução nutritiva contendo o triplo da concentração ideal de potássio, deram origem a calos com teor de proteínas significativamente maior, na avaliação feita aos 28 dias *in vitro*, que de calos de plantas tratadas com os demais teores de potássio.

O íon potássio está diretamente relacionado ao balanço carbono-nitrogênio das plantas. A necessidade de potássio para enzimas reguladoras da oxidação de carboidratos, como piruvato-quinase (Miller & Evans, 1957; Tomlinson & Turner, 1973) e 6-fosfofrutoquinase (Läuchli & Pflüger, 1978), proporciona, na presença de disponibilidade de potássio uma aceleração do metabolismo de carboidratos, promovendo a síntese de maior quantidade de ácidos orgânicos, que em situações de disponibilidade de nitrogênio promove a assimilação de amônia, resultando em maior síntese de aminoácidos e conseqüentemente proteínas. Além disso o potássio é necessário para a síntese e ativação da nitrato redutase (Marschner, 1995). Esta função do potássio está,

Figura 12- Efeito do tratamento de plantas matrizes de *B. forficata* com $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$, $1X$, $2X$ e $3X$ da concentração do nutriente potássio presente na solução nutritiva de Sarruge (1975), ao longo de 60 dias no teor de proteína de calos secos ($\mu\text{g/mg MMS calo}$). Avaliações feitas aos 28 (A) e 56 (B) dias *in vitro*.

portanto certamente relacionada ao incremento dos teores de proteínas de calos em explantes precedentes de plantas tratadas com crescentes níveis de potássio na solução nutritiva.

A única exceção ocorrida foi com relação aos calos provenientes de plantas tratadas por 45 dias com solução nutritiva contendo 2X K, que apresentaram teor de proteínas significativamente menor que de calos obtidos de plantas tratadas com os demais níveis do nutriente, apenas na avaliação feita após 56 dias *in vitro*.

A regressão linear para os níveis de potássio foi significativa, havendo uma tendência de acúmulo de proteínas com o aumento nos níveis de potássio das soluções nutritivas. O potássio é necessário para a ativação de um grande número de enzimas (Hopkins, 1995) devendo ter sido o responsável pelo maior teor de proteínas apresentado pelos calos provenientes de plantas cultivadas em concentrações elevadas de potássio e pelo menor teor protéico nos calos de plantas, supostamente deficientes em potássio.

5- CONCLUSÕES

A calogênese em *B. forficata* é afetada pelo estado nutricional em cálcio, magnésio e potássio das matrizes fornecedoras dos explantes.

A calogênese avaliada em massa de matéria seca dos calos foi maior em explantes de matrizes tratadas com baixos níveis de cálcio, a qual foi também influenciada positivamente pela duração dos tratamentos.

Tratamentos com altos e baixos teores de magnésio ou potássio, com relação à concentração da solução nutritiva completa afetam negativamente a calogênese.

O teor de proteína nos calos foi inversamente proporcional ao tratamento com cálcio e diretamente proporcional ao tratamento com potássio.

Concentrações de magnésio superiores e inferiores aos da solução nutritiva completa afetam negativamente o teor de proteína dos calos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITCHISON, P.A., MAGLEOD, A.J.; YEOMAN, M.M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: **Plant and Cell Culture**. Oxford: Balckwell Scientific Publications, 1977. p.267-306.
- ALLAN, E.; HEPLER, P.K. Calmodulin and calcium-biding proteins. In: STUMP, P.K. & CONN, E.E., Ed. **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1989. v.15: Molecular biology, p.455-484.
- ANDRIJANY, V.S.; INDRAYANTO, G.; SOEHONO, L.A. Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt ions on sapogenin steroids content in callus cultures of *Agave amaniensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p.103-108, 1999.
- ARRUDA, S.C.C. Efeito do Cálcio na indução de embriogênese somática de *Eucalyptus urophylla*. Piracicaba, 2000. 74p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- AUGÉ, R. **La Culture In Vitro et ses Applications Horticoles**. ParisL: Technique et Documentation (Lavoisier), 1984. 152p.

- BAIER, D.; LATZKO, E. Properties and regulations of C-1-fructose 1,6-diphosphate from spinach chloroplasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.396, p.141-148, 1976.
- BOSS, W.F.; GRIMES, H.D.; BRIGHTMAN, A. Calcium-induced fusion of fusogenic wild carrot protoplasts. **Protoplasma**, v.120, p.209-215, 1984.
- BOTTRILL, D.E.; POSSINGHAM, J.V.; KRIEDEMANN, P.E. The effect of nutrient deficiencies on photosynthesis and respiration in spinach. **Plant and Soil**, v.32, p.424-438, 1970.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BROWN, S.; WETHERELL, D.F.; DOULGALL, D.K. The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. **Physiologia Plantarum**, v.37, p.73-79, 1976.
- BROWNLEE, C.; GODDARD, H.; HETHERINGTON, A.M.; PEAKE, L.A. Specificity and integration of responses: Ca^{2+} as a signal in polarity and osmotic regulation. **Journal of Experimental Botany**, v.50, Special Issue, p.1001-1011, June, 1999.
- BUSH, D.S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.95-122, 1995.
- BUSSLER, W. Die Entwicklung von Calcium-Mangelsymptomen. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, v.100, p.53-58, 1963.

- BUSSLER, W. Die Bormangelsymptome und ihre Entwicklung. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, v.105, p.113-136, 1964.
- BURSTRÖM, H. Calcium and plant growth. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v.43, p.287-316, 1968.
- CALDWELL, C.R.; HAUG, A. Temperature dependence of the barley root plasma membrane-bound Ca^{2+} and Mg^{2+} -dependent ATPase. **Physiologia Plantarum**, v.53, p.117-124, 1981.
- CAMMARANO, P.; FELSANI, A.; GENTILE, M.; GUALERZI, C.; ROMEO, C.; WOLF, G. Formation of active hybrid 80-S particles from subunits of pea seedlings and mammalian liver ribosomes. **Biochimica Biophysica Acta**, v.281, p.625-642, 1972.
- CANHOTO, J.M.; LUDOVINA, M.; GUIMARÃES, S.; CRUZ, G.S. In vitro induction of haploid, diploid and triploid plantlets by anther culture of *Ioichroma warscewiczii* Regel. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, p.171-177, 1990.
- CHEUNG, W.Y. Calmodulin Plays a Pivotal Role in Cellular Regulation. **Science**, v.207, n. 4, p.19-27, Jan. 1980.
- CHOI, Y.E.; YANG, D.C.; CHOI, K.T. Induction of somatic embryos by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, v.52, p.177-181, 1998.
- CLELAND, R.E.; RAYLE, D.L. Reevaluation of the effect of calcium ions on auxin-induced elongation. **Plant Physiology**, v.60, p.709-712, 1977.

COLLINS, H.A.; WATTS, M. Flavor production in culture. In: EVANS, D.A., SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y. **Handbook of Plant Cell and Tissue Culture**, vol.1, Techniques for propagation and breeding. New York: MacMillan, 1983. p.729-747.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Serviço de Informação agrícola. 1975. 687p. (v.5)

COSTA, O.A. Estudo farmacoquímico da unha-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link). **Revista da Flora Medicinal**, v.9, n.4, p.175-189, 1942.

CRUZ, G.L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1982. 599p.

DAVIES, P.J. **Plant Hormones**. 2.ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. 833p.

DESMAREST, P.; DUMANOIR, J. Principales recherches et perspective d'utilisation des cultures in vitro dans le domaine des plantes aromatiques. **Les Cultures Vegetales In Vitro**, Paris: Association pour la Promotion Industrie Agriculture, 1982, p.87-91.

DIETER, P. Calmodulin and calmodulin-mediated processes in plants. **Plant, Cell Environment**, v.7, p.371-380, 1984.

- DUSSERT, S.; VERDEIL, J.L.; RIVAL, A.; NIROT, M.; BUFFARD-MOREL, J. Nutrient uptake and growth of in vitro coconut (*Cocos nucifera* L.) calluses. **Plant Science**, v.106, p.185-193, 1995a.
- DUSSERT, S.; VERDEIL, J.L.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. **Plant Science**, v.111, p.229-236, 1995b.
- EEUWENS, C.J. Mineral requirements for Growth and Callus Initiation of Tissue Explants Excised from Nature Coconut Palms (*Cocos nucifera* L.) and Cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.36, n.1, p.23-28, 1976.
- ELLIOTT, D.C. Inhibition of cytokinin-regulated responses by calmodulin-binding compounds. **Plant Physiology**, v.72, p.215-218, 1983.
- ETIENNE, H.; LARTAUD, M.; CARRON, M.P.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). **Journal of Experimental Botany**, v.48, n.306, p.129-137, Jan. 1997.
- EVANS, L.T.; WILDES, R.A. Potassium and its role in enzyme activation. In: COLLOQUIUM OF THE INTERNATIONAL POTASH INSTITUTE, 8., Bern, 1971. **Proceedings**. Bern: IPI, 1971. p.13-39.
- FELLE, H.H. Aspects of Ca^{2+} homeostasis in *Riccia fluitans*: reactions to perturbations in cytosolic-free Ca^{2+} . **Plant Science**, v.74, p.27-33, 1991.
- FISHER, J.D.; HODGES, T.K. Monovalent ion stimulated adenosine triphosphatase from oat roots. **Plant Physiology**, v.44, p.385-395, 1969.

FREISE, F.W. **Plantas Medicinais Brasileiras**. São Paulo: Secretaria de Agricultura, 1933. p.233-294 (Boletim de Agricultura).

GUERRA, M.P. Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. (PALMAE). São Paulo, 1989. 233p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

HAYASHI, T.; YOSHIDA, K.; SANO, K. Formation of alkaloids in suspension-cultured *Colchicum autumnale*. **Phytochemistry**, v.27, n.5, p.1371-1374, 1988.

HE, D.G.; YANG, Y.M.; SCOTT, K.J. The effect of macroelements in the induction of embryogenic callus from immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Science**, v.64, n.2, p.251-258, 1989.

HEENAN, D.P.; CAMPBELL, L.C. Influence of potassium and manganese on growth and uptake of magnesium by soybeans (*Glycine max* (L.) Merr. cv Bragg). **Plant Soil**, v.61, p.447-456, 1981.

HEPLER, P.K.; WAYNE, R.O. Calcium and Plant Development. **Annual Review of Plant Physiology**, v.36, p.397-439, 1985.

HOPKINS, W.G. **Introduction to Plant Physiology**. United States of America: Wiley, 1995. 464p.

HUSH, J.M.; OVERALL, R.L.; NEWMAN, I.A. A calcium influx precedes organogenesis in *Graptopetalum*. **Plant Cell Environment**, v.14, p.657-665, 1991.

- JACOBSON, L. Maintenance of iron supply in nutrient solutions by a single addition of ferric potassium ethylene diamine tetra acetate. **Plant Physiology**, v.26, p.411, 1951.
- JANSEN, M.A.R.; BOOLF, H.; SCHEL, J.H.N.; URIES, S.C. Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v.9, p.221-223, 1990.
- JONES, R.L.; CARBONELL, J. Regulation of the synthesis of barley aleurone α -amylase by gibberellic acid and calcium ions. **Plant Physiology**, v.76, p.213-218, 1984.
- JOSEKUTTY, P.C. Calcium mediated callus induction in *Impatiens flanaganiae*. **International Journal of Experimental Botany**, v.62, n.1/2, p.199-203, 1998.
- JULIANE, C. Ação hypoglucemiante da Unha-de-vaca (*B. forficata*). **Jornal dos Clínicos**, v.12, n.12, p.165-169, 1931.
- KARP, G. **Cell and Molecular Biology: concepts and experiments**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996. 773p.
- KAUSS, H. Volume regulation in *Poteroiochromonas*: Involvement of calmodulin in the Ca^{2+} -stimulated activation of isofloridoside-phosphate synthase. **Plant Physiology**, v.71, p.169-172, 1983.
- KIYOSAWA, K. Unequal distribution of potassium and anions within the *Phaseolus* pulvins during circadian leaf movement. **Plant Cell Physiology**, v.20, p.1621-1634, 1979.

KONNO, H.; YAMAYA, T.; YAMASHI, Y. AND MATSUMOTO, H. Pectic polysaccharide break-down of cell walls in cucumber roots grown with calcium starvation. **Plant Physiology**, v.76, p.633-637, 1984.

KUHLMANN, M.; KÜHN, E. **A flora do distrito de Ibiti**. São Paulo: Instituto de Botânica. 1947.

KUIPER, P.J.C.; KÄHR, M.; STUIVER, C.E.E.; KYLIN, A. Lipid composition of whole roots and of Ca^{2+} , Mg^{2+} -activated adenosine triphosphatases from wheat and oat as related to mineral nutrition. **Physiologia Plantarum**, v.32, p.33-39, 1974.

KURVITS, A.; KIRKBY, E.A. The uptake of nutrients by sunflower plants (*Helianthus annuus*) growing in a continuous flowing culture system, supplied with nitrate or ammonium as nitrogen source. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, v.143, p.140-149, 1980.

LA CLAIRE, J.W.I. Wound-healing mobility in the green alga *Ernodesmis*: Calcium ions and metabolic energy are required. **Planta**, v.156, p.466-474, 1982.

LÄUCHLI, A.; PFLÜGER, R. Potassium transport through plant cell membranes and metabolic role of potassium in plants. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL POTASH INSTITUTE, 11., Bern, 1978. **Proceedings**. Bern: IPI, 1978. p.111-163.

LEGGE, R.L.; THOMPSON, E.; BAKER, J.E.; LIEBERMAN, M. The effect of calcium on the fluidity and phase properties of microsomal membranes isolated from postclimateric Golden Delicious apples. **Plant Cell Physiology**, v.23, p.161-169, 1982.

- LEHTONEN, J. The significance of Ca^{2+} in the morphogenesis of micrasterias studied with EGTA, verapamil, LaCl_3 and calcium ionophore A 23187. **Plant Science Letters**, v.33, p.53-60, 1984.
- LESHEM, Y.Y.; SRIDHARA, S.; THOMPSON, J.E. Involvement of calcium and calmodulin in membrane deterioration during senescence of pea foliage. **Plant Physiology**, v.75, p.329-335, 1984.
- MACROBBIE, E.A.C. Effects of ABA in "isolated" guard cells of *Commelina communis* L. **Journal of Experimental Botany**, v.32, p.563-572, 1981.
- MAGNAVAL, C.; NOIROT, M.; VERDEIL, J.L.; BLATTES, A.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; BEULÉ, T.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutritional requirements of coconut calli (*Cocos nucifera* L.) during somatic embryogenesis induction. **Journal of Plant Physiology**, v.150, p.719-728, 1997.
- MARMÉ, D. Calcium transport and function. In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R.L. **Encyclopedia of Plant Physiology**. New York: Springer-Verlag, 1983. v.15B. p.599-625.
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of higher plants**. London: Academic Press Limited, 1995. 889p.
- MASCARENHAS, J.P.; MACHLIS, L. Chemotropic response of the pollen of *Antirrhinum majus* to calcium. **Plant Physiology**, v.39, p.70-77, 1964.
- MCLAUGHLIN, S.B.; WIMMER, R. Tansley Review No. 104 - Calcium physiology and terrestrial ecosystem processes. **New Phytologist**, v.142, p.373-417, 1999.

- MCSWAIN, B.D.; TSUJIMOTO, H.Y.; ARNON, D.I. Effects of magnesium and chloride ions on light-induced electron transport in membrane fragments from a blue-green alga. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.423, p.313-322, 1976.
- MILLER, G.; EVANS, H.J. The influence of salts on Pyruvate Kinase from tissues of higher plants. **Plant Physiology**, v.32, p.346-354, 1957.
- MITTELHEUSER, C.J.; VAN STEVENINCK, R.F.M. Rapid action of abscisic acid on photosynthesis and stomatal resistance. **Planta**, v.97, p.83-86, 1971.
- MIYAKE, E.T.; AKISUE, M.K. Caracterização farmacognóstica da pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n.1, p.58-68, 1986.
- MOLINA, S.M.; CARREÑO, I.L. Control of organogenesis *in vitro* of *Pistacia atlantica* Desf. rootstock. **Acta Horticulturae**, v.289, p.135-136, 1991.
- MONTORO, P.; ETIENNE, H.; CARRON, M.P. Effect of calcium on callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg.: relations with callus mineral nutrition, nitrogen metabolism and water parameters. **Journal of Experimental Botany**, v.46, n.283, p.255-261, Feb. 1995.
- MORARD, P.; HENRY, M. Optimization of the mineral composition of in vitro culture media. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, n.8, p.1565-1576, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

- O'NEILL, S.D.; JOY, K.W. Glutamine synthetase of pea leaves. Divalent cation effects, substrate specificity, and other properties. **Plant Physiology**, v.54, p.775-779, 1974.
- OVERVOORDE, P.J.; GRIMES, H.D. The role of calcium and calmodulin in carrot somatic embryogenesis. **Plant Cell Physiology**, v.35, n.2, p.135-144, 1994.
- PALLAGHY, C.K. The effect of Ca^{++} on the ion specificity of stomatal opening in epidermal strips of *Vicia faba*. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, v.62, p.58-62, 1970.
- PAYNE, G.F., PAYNE, N.N., SHULER, M.L. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p.905-912, 1988.
- PEDROSO, M.C.; PAIS, M.S. A scanning electron microscopy and X-ray microanalysis study during induction of morphogenesis in *Camellia japonica* L. **Plant Science**, v.87, p.99-108, 1992.
- PISSAREK, H.P. Zur Entwicklung der Kalium-Mangelsymptome von Sommerraps. **Z. Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde**, v.136, p.1-19, 1973.
- PORTIS JUNIOR, A.R.; HELDT, H.W. Light-dependent changes of the Mg^{2+} concentration in the stroma in relation to the Mg^{2+} depending of CO_2 fixation in intact chloroplasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.449, p.434-446, 1976.
- PRAKASH, E.; SHA VALLI KHAN, P.S.; SAIRAM REDDY, P.; RAO, K.R. Regeneration of plants from seed-derived callus of *Hybanthus enneaspermus* L. Muell., a rare ethnobotanical herb. **Plant Cell Reports**, v.18, p.873-878, 1999.

- PREUSSER, E.; KHALIL, F.A.; GÖRING, H. Regulation of activity of the granule-bound starch synthetase by monovalent cations. **Biochemische und Physiologie für Pflanzenernährung**, v.176, p.744-752, 1981. /resumo em **CAB abstracts on CD-ROM**, 1982/
- RATHORE, K.S.; HODGES, T.K.; ROBINSON, K.R. Ionic basis of currents in somatic embryos of *Daucus carota*. **Planta**, v.175, p.280-289, 1988.
- ROBERTS, A.W.; HAIGLER, C.H. Tracheary-element differentiation in suspension-cultured cells of *Zinnia* requires uptake of extracellular Ca^{2+} . **Planta**, v.180, p.502-509, 1990.
- RIGNEY, C.J.; WILLS, R.B.H. Calcium movement, a regulating factor in the initiation of tomato fruit ripening. **HortScience**, v.16, p.550-551, 1981.
- SARRUGE, J.R. Soluções Nutritivas. **Summa Phytopatologica**, v.1, p.231-233, 1975.
- SATTER, R.L.; APPLEWHITE, P.B.; GALSTON, A.W. Rhythmic potassium flux in *Albizia*. Effect of aminophylline, cations and inhibitors of respiration and protein synthesis. **Plant Physiology**, v.54, p.280-285, 1974.
- SATTER, R.L.; GALSTON, A.W. Mechanisms of control of leaves movements. **Annual Review of Plant Physiology**, v.32, p.83-110, 1981.
- SCHMIT, J.N. Le calcium dans le cellule génératrice en mitose. Étude dans le tube pollinique en germination de *Clivia nobilis* Lindl. (Amaryllidaceae) C.R. **Comptes rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, v.293, p.755-760, 1981. (Ser.III)

- SCHNEPF, E.; VOLKMANN, K. Inhibition of traumatotactic movement of nuclei in *Tradescantia* leaf epidemis II. Effects of heavy water, ethionine, Ca^{++} , and cyclic AMP. **Protoplasma**, v.81, p.313-321, 1974.
- SPERRAZZA, J.M.; SPREMULLI, L.L. Quantitation of cation binding to wheat germ ribosomes: influences on subunit association equilibria and ribosome activity. **Progress in Nucleic Acid Research**, v.11, p.2665-2679, 1983.
- STABA, E.J. Tissue culture and pharmacy. In: (Ed). REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977. p.649-702.
- SUELTER, C.H. Enzymes activated by monovalent cations. **Science**, v.168, p.789-795, 1970.
- SUGIYAMA, T.; NAKYAMA, N.; AKAZAWA, T. Structure and function of chloroplast proteins. V. Homotropic effect of bicarbonate in RuBP carboxylase relations and the mechanism of activation by magnesium ions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.126, p.734-745, 1968.
- TABAI, S.A. Propagação da Palmeira Macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges. Através de Métodos *in vitro*. Piracicaba, 1992. 121p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- TOMLINSON, J.D.; TURNER, J.F. Piruvate Kinase of higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.329, p.128-139, 1973.

- TORIYAMA, H., JAFFE, M.J. Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cell of *Mimosa pudica* L. **Plant Physiology**, v.49, p.72-81, 1972.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. 433p.
- VAN STEVENINCK, R.F.M. The significance of calcium on the apparent permeability of cell membranes and the effects of substitution with other divalent ions. **Physiologia Plantarum**, v.18, p.54-69, 1965.
- VESK, M.; POSSINGHAM, V.; MERCER, F.V. The effect of mineral nutrient deficiency on the structure of the leaf cell of tomato, spinach and maize. **Australian Journal of Botany**, v.14, p.1-18, 1966.
- VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia - Manual das Plantas Medicinais**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992. p.185-186.
- WARD, J.M.; ZHEN-MING, P.; SCHROEDER, J.I. Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. **The Plant Cell**, v.7, p.833-844, July, 1995.
- WOODS, C.M.; POLITO, V.S.; REID, M.S. Response to chilling stress in plant cells. II. Redistribution of intracellular calcium. **Protoplasma**, v.121, p.17-24, 1984.
- WYN JONES, R.G.; LUNT, O.R. The function of calcium in plants. **Botanical Review**, v.33, p.407-426, 1967.

- WYN JONES, R.G.; BRADY, C.J.; SPEIRS, J. Ionic and osmotic relations in plant cells. In: LAIDMAN, D.L.; WYN JONES, R.G. **Recent Advances in the Biochemistry of Cereals**. London: Academic Press, 1979. p.63-103.
- YEOMAN, M.M. Bypassing the plant. **Annals of Botany**, v.60, suppl.4, p.157-174, 1987.
- ZIV, M.; GADASI, G. Enhanced embryogenesis and plant regeneration from cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus by activated charcoal in solid/liquid double-layer culture. **Plant Science**, v.47, p.115-122, 1986.
- ZOCCHI, G.; HANSON, J.B. Calcium influx into corn roots as a result of cold shock. **Plant Physiology**, v.7, p.318-319, 1982.
- ZSOLDOS, F.; KARVALY, B. Effects of Ca^{2+} and temperature on potassium uptake along roots of wheat, rice and cucumber. **Physiologia Plantarum**, v.43, p.326-330, 1978.

APÊNDICE

Tabela A1- Médias (g/planta) e coeficientes de variação da massa de matérias fresca e seca foliar de cada tratamento ao longo de 60 dias.

Tratamento	Tempo de Tratamento	Folhas Frescas		Folhas Secas	
		média	CV	média	CV
Testemunha	15	0,43	47,22	0,11	49,33
	30	0,80	42,90	0,18	56,28
	45	0,72	50,66	0,18	67,41
	60	1,23	29,55	0,41	36,03
$\frac{1}{4}$ x Ca	15	0,47	27,09	0,09	36,05
	30	0,69	47,49	0,14	68,19
	45	0,89	47,04	0,23	59,09
	60	1,12	34,47	0,37	37,03
$\frac{1}{2}$ x Ca	15	0,38	24,15	0,08	45,36
	30	0,71	44,04	0,17	53,90
	45	0,74	42,42	0,17	57,69
	60	1,10	34,31	0,35	43,46
2x Ca	15	0,40	26,99	0,09	44,72
	30	0,69	45,26	0,16	56,89
	45	0,80	49,21	0,20	59,95
	60	0,98	45,33	0,30	58,20
3x Ca	15	0,38	30,72	0,08	53,44
	30	0,76	27,54	0,21	32,05
	45	0,76	39,71	0,19	49,31
	60	1,05	36,61	0,40	58,03
$\frac{1}{4}$ x Mg	15	0,41	31,37	0,08	51,15
	30	0,51	49,96	0,12	54,72
	45	0,79	46,94	0,19	67,85
	60	1,20	36,20	0,36	56,50
$\frac{1}{2}$ x Mg	15	0,43	32,76	0,10	44,99
	30	0,69	36,03	0,17	37,53
	45	0,91	46,41	0,22	53,93
	60	1,03	43,93	0,40	43,78
2x Mg	15	0,36	20,44	0,08	35,50
	30	0,52	48,25	0,13	58,29
	45	0,76	44,55	0,19	47,80
	60	0,97	41,87	0,31	56,01
3x Mg	15	0,42	38,48	0,09	58,02
	30	0,58	32,31	0,15	37,42
	45	0,80	51,11	0,23	75,20
	60	1,02	41,61	0,31	50,91
$\frac{1}{4}$ x K	15	0,47	35,38	0,12	41,18
	30	0,59	46,00	0,16	49,50
	45	0,93	45,60	0,23	66,20
	60	1,47	30,74	0,43	59,82
$\frac{1}{2}$ x K	15	0,41	35,36	0,09	47,62
	30	0,58	37,25	0,15	44,59
	45	0,69	39,04	0,15	59,87
	60	1,29	33,58	0,35	49,91
2x K	15	0,36	26,41	0,07	47,75
	30	0,46	24,08	0,11	47,33
	45	0,82	52,53	0,18	66,89
	60	1,07	35,68	0,34	50,39
3x K	15	0,41	31,97	0,09	45,00
	30	0,60	26,61	0,14	34,53
	45	0,74	44,25	0,16	57,82
	60	1,15	36,30	0,28	60,57

Tabela A2- Médias e coeficientes de variação das massas de matérias fresca e seca (g/calor) e teor de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MMS calor) para tratamentos testemunha e níveis de cálcio ao longo de 60 dias em vasos e 56 dias *in vitro*.

Tratamento	Tempo de Tratamento	Período <i>in vitro</i>	Calos Frescos		Calos Secos		Teor de Proteínas	
			média	CV	média	CV	média	CV
Testemunha	15	28	36,48	32,95	0,04	31,99	26,91	38,81
		56	101,70	35,83	0,09	35,56	24,13	41,72
	30	28	11,00	27,52	0,04	38,95	27,06	24,63
		56	26,24	42,45	0,07	37,64	32,65	36,15
	45	28	5,61	26,00	0,03	58,71	29,60	50,20
		56	21,26	28,59	0,14	18,34	24,84	46,74
	60	28	8,71	19,03	0,03	24,23	26,43	29,85
		56	25,31	16,76	0,13	15,27	34,81	34,34
$\frac{1}{4}\text{x Ca}$	15	28	36,13	18,86	0,03	15,03	24,53	33,95
		56	81,24	25,49	0,08	26,32	33,09	54,20
	30	28	10,28	24,07	0,04	45,52	29,59	41,00
		56	38,42	33,41	0,07	47,18	29,32	29,89
	45	28	10,39	25,94	0,04	11,33	18,09	53,44
		56	32,26	23,00	0,12	37,68	19,12	59,91
	60	28	10,43	7,89	0,04	22,89	29,04	40,49
		56	32,15	18,23	0,15	6,32	24,04	43,49
$\frac{1}{2}\text{x Ca}$	15	28	25,59	22,20	0,03	31,45	24,88	42,73
		56	46,73	41,79	0,09	18,38	32,65	26,27
	30	28	12,11	46,05	0,03	64,41	17,81	39,54
		56	34,91	9,3819	0,10	23,03	35,02	40,31
	45	28	9,49	19,21	0,03	32,77	13,83	76,93
		56	34,28	34,98	0,13	23,17	18,25	52,61
	60	28	9,02	34,50	0,02	44,65	19,98	46,28
		56	24,71	34,15	0,15	14,05	10,80	28,20
2x Ca	15	28	15,11	21,02	0,02	39,65	10,16	53,22
		56	34,74	31,27	0,05	34,24	10,76	36,02
	30	28	7,86	29,07	0,04	38,17	13,60	39,24
		56	22,06	29,60	0,06	43,23	22,64	45,17
	45	28	7,86	26,84	0,02	34,96	15,17	56,71
		56	14,01	94,37	0,06	16,94	3,80	92,86
	60	28	8,56	23,07	0,02	73,79	14,12	30,44
		56	31,47	24,53	0,13	20,95	9,12	23,62
3x Ca	15	28	18,56	30,24	0,03	48,10	7,90	39,15
		56	52,76	42,38	0,06	41,91	11,57	39,22
	30	28	12,21	30,58	0,04	9,40	7,79	56,48
		56	29,87	47,41	0,06	45,25	16,94	24,40
	45	28	6,57	38,69	0,02	22,70	13,66	23,54
		56	28,31	76,62	0,07	58,45	8,20	73,82
	60	28	9,52	25,12	0,01	42,00	18,03	9,02
		56	29,11	19,85	0,14	34,28	11,38	41,56

Tabela A3- Médias e coeficientes de variação das massas de matérias fresca e seca (g/calor) e teor de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MMS calor) para tratamentos com teores de magnésio ao longo de 60 dias em vasos e 56 dias *in vitro*.

Tratamento	Tempo de Tratamento	Período <i>in vitro</i>	Calos Frescos		Calos Secos		Teor de Proteínas	
			média	CV	média	CV	média	CV
$\frac{1}{4}\text{x Mg}$	15	28	24,14	21,97	0,02	42,19	8,30	44,84
		56	62,80	32,75	0,10	25,52	12,02	22,17
	30	28	16,88	25,57	0,04	27,96	20,71	21,68
		56	44,85	50,27	0,06	36,96	23,16	18,28
	45	28	5,67	18,20	0,02	42,39	10,63	29,06
$\frac{1}{2}\text{x Mg}$	15	28	13,78	25,26	0,02	63,57	23,75	23,25
		56	30,41	35,58	0,05	53,61	21,25	22,04
	30	28	13,62	37,44	0,03	13,48	18,59	27,97
		56	47,74	28,51	0,06	49,22	24,11	25,61
	45	28	10,85	26,07	0,03	64,81	22,94	19,34
2x Mg	15	28	30,89	29,43	0,11	30,32	23,49	16,83
		56	10,53	14,71	0,03	44,68	16,08	9,75
	30	28	30,12	20,41	0,15	12,70	7,76	54,51
		56	19,70	23,96	0,02	23,70	20,74	10,29
	45	28	44,73	37,04	0,08	33,34	24,92	6,33
3x Mg	15	28	12,38	33,11	0,06	37,09	11,17	29,16
		56	22,01	30,00	0,02	88,05	14,13	38,80
	30	28	9,00	42,87	0,03	44,05	18,47	23,78
		56	26,86	33,81	0,12	19,05	19,16	19,79
	45	28	6,21	24,30	0,01	59,44	18,87	15,00
3x Mg	15	28	18,50	29,38	0,14	21,24	10,47	29,91
		56	14,50	18,74	0,02	23,15	10,20	25,70
	30	28	30,86	29,60	0,08	32,11	14,41	22,18
		56	12,19	34,15	0,05	39,75	20,61	31,83
	45	28	22,53	45,59	0,05	27,11	20,25	49,18
3x Mg	15	28	8,90	33,82	0,03	14,56	12,14	16,71
		56	29,58	83,36	0,12	27,37	13,85	44,71
	30	28	9,53	27,77	0,02	59,60	20,17	39,81
		56	31,73	27,83	0,16	12,77	14,20	22,07
	45	28	31,73	27,83	0,16	12,77	14,20	22,07

Tabela A4- Médias e coeficientes de variação das massas de matérias fresca e seca (g/calor) e teor de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MMS calor) para tratamentos com teores de potássio ao longo de 60 dias em vasos e 56 dias *in vitro*.

Tratamento	Tempo de Tratamento	Período <i>in vitro</i>	Calos Frescos		Calos Secos		Teor de Proteínas	
			média	CV	média	CV	média	CV
$\frac{1}{4}\text{x K}$	15	28	20,03	41,08	0,02	23,17	11,99	29,54
		56	57,91	43,86	0,09	25,56	17,90	30,95
	30	28	29,27	59,44	0,05	30,67	24,96	38,54
		56	60,28	62,61	0,06	13,12	28,48	30,46
	45	28	7,57	47,09	0,02	17,53	21,37	23,18
$\frac{1}{2}\text{x K}$	15	28	27,27	52,51	0,13	22,16	15,52	41,35
		56	9,07	26,89	0,01	40,16	31,64	43,94
	30	28	31,54	22,38	0,15	15,34	27,34	45,34
		56	10,98	19,95	0,01	61,54	29,80	39,90
	45	28	22,42	39,06	0,06	31,90	32,00	40,55
2x K	15	28	29,56	33,03	0,06	19,38	25,44	33,91
		56	47,68	35,63	0,04	14,00	31,47	38,37
	30	28	6,21	52,49	0,02	53,18	22,49	48,26
		56	27,33	83,31	0,13	37,44	26,25	28,92
	45	28	11,54	29,86	0,02	67,77	36,57	39,77
3x K	15	28	34,03	28,13	0,13	15,25	25,91	28,26
		56	18,76	14,60	0,02	24,89	37,16	44,55
	30	28	46,87	56,67	0,08	25,06	38,92	35,49
		56	12,18	22,72	0,04	22,59	20,95	46,94
	45	28	23,78	26,24	0,06	24,83	37,53	49,64
4x K	15	28	8,92	44,17	0,03	36,54	29,02	47,20
		56	19,39	121,95	0,03	142,59	6,48	121,42
	30	28	11,54	15,09	0,03	51,93	31,54	40,51
		56	37,53	21,53	0,13	17,94	28,69	42,08
	45	28	15,31	37,98	0,02	26,27	26,98	47,99
5x K	15	28	25,90	61,17	0,05	55,23	23,99	53,45
		56	17,72	29,45	0,06	34,23	30,91	47,46
	30	28	31,84	30,92	0,05	52,44	42,93	29,02
		56	7,96	30,30	0,03	38,52	40,03	45,04
	45	28	24,74	37,05	0,05	53,98	33,88	36,21
6x K	15	28	7,75	20,65	0,01	65,55	59,59	17,34
		56	22,81	25,79	0,12	19,41	34,47	38,35