**EFEITO DO ESTADO NUTRICIONAL EM N, K⁺, Ca²⁺ E Mg²⁺ DE MATRIZES
DE CRAVO (*Dianthus caryophyllus* L., CARYOPHYLLACEAE) NA
CALOGÊNESE *in vitro***

TELMA KAZUMI HAYASHI

Engenheiro Agrônomo

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

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 2000

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

Hayashi, Telma Kazumi.

Efeito do estado nutricional em N, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ de matrizes de cravo
(*Dianthus caryophyllus* L., Caryophyllaceae) na calogênese *in vitro* / Telma Kazumi
Hayashi. - - Piracicaba, 2000.

75 p.

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

1. Cálcio 2. Calogênese 3. Cravo 4. Cultivo in vitro 5. Estufa 6. Magnésio 7.
Nitrogênio 8. Potássio 9. Solução nutritiva I. Título

CDD 635.933152

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

Aos meus pais Shinsaku e Kazuko,
com muito amor e carinho,
dedico.

Às minhas sobrinhas Carolina e Isabela,
com muita alegria e carinho,
ofereço.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Murilo de Melo, pela orientação e pelos ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Quirino Augusto de Camargo Carmello, pela elaboração da composição química das soluções nutritivas utilizadas neste trabalho.

Ao produtor Sr. Theodorus Gerardus Maria Van Schaik, pela cessão das mudas de cravo utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Décio Barbin e ao Dr. Adônis Moreira, pelo auxílio na elaboração do delineamento experimental e análises estatísticas, respectivamente.

À Antônio Francisco de Campos Amaral, Técnico de Nível Superior do Depto. de Ciências Biológicas-CEBTEC, pelo apoio técnico na realização do trabalho e pela amizade.

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia Sabino e Sílvia Zinsly, pela revisão das referências bibliográficas.

Aos professores e funcionários do Depto. de Ciências Biológicas da ESALQ, pelos auxílios prestados e pela amizade.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, por ter possibilitado a realização deste presente trabalho.

Ao biólogo e amigo Fábio Borgatto, pelos auxílios prestados durante a realização deste trabalho e principalmente pela amizade.

Aos amigos Adônis Moreira, Alcides M.B. Mateus Jr., Antônio C.C. Marchiori, Daniela Defávares, Iracilda M. Rossini, José L.B. Fontes, Juliana A. Fernando, Larissa A.C. Moraes, Lucimara R. Antonioli, pela amizade.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela amizade e companheirismo durante o curso.

À minha irmã Adriana, pelos auxílios prestados, incentivo e compreensão, e à minha irmã Paula e às minhas sobrinhas Carolina e Isabela, pelo carinho.

Aos meus pais, Shinsaku e Kazuko, pelo carinho e pelo constante apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À Deus. Obrigada.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Cultura do cravo.....	5
2.2 Aspectos econômicos.....	6
2.3 Nutrição mineral.....	8
2.3.1 Função do nitrogênio na planta.....	9
2.3.2 Função do potássio na planta.....	10
2.3.3 Função do cálcio na planta.....	12
2.3.4 Função do magnésio na planta.....	13
2.4 Cultura de tecidos.....	14
2.5 Fatores nutricionais que afetam a cultura de tecidos.....	19
2.5.1 Nitrogênio.....	20
2.5.2 Potássio.....	21
2.5.3 Cálcio.....	23
2.5.4 Magnésio.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Local.....	27
3.2 Plantio das mudas.....	27
3.3 Tratamentos.....	27

3.4 Coleta de explantes.....	28
3.5 Assepsia do material vegetal.....	28
3.6 Indução de calogênese.....	30
3.7 Avaliação da calogênese.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Tratamento com nitrogênio (Experimento 1).....	33
4.1.1 Folha.....	34
4.1.2 Entrenós e nó.....	35
4.2 Tratamento com potássio (Experimento 2).....	42
4.2.1 Folha.....	42
4.2.2 Entrenós e nó.....	44
4.3 Tratamento com cálcio (Experimento 3).....	48
4.3.1 Folha.....	48
4.3.2 Entrenós e nó.....	50
4.4 Tratamento com magnésio (Experimento 4).....	54
4.4.1 Folha.....	54
4.4.2 Entrenós e nó.....	56
5 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

Página

- 1 Efeito dos tratamentos com nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio na calogênese (massa de matéria fresca e seca de calos em g/explante) em explante folha de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L. 39
- 2 Efeito dos tratamentos com nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio na calogênese (massa de matéria fresca e seca de calos em g/explante) em explante entrenós de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L. 40
- 3 Efeito dos tratamentos com nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio na calogênese (massa de matéria fresca e seca de calos em g/explante) em explante nó de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L. 41

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Composição química das diferentes soluções nutritivas (mL L ⁻¹) adaptada de Sarruge (1975), empregadas no tratamento de matrizes de <i>Dianthus caryophyllus</i> L.	29
2 Composição em nutrientes das soluções nutritivas utilizadas nos tratamentos para a nutrição de matrizes de <i>Dianthus caryophyllus</i> L.	30
3 Componentes nutricionais do meio básico de Murashige & Skoog (1962) empregados na indução de calogênese em explantes de matrizes de <i>Dianthus caryophyllus</i> L.	32

**EFEITO DO ESTADO NUTRICIONAL EM N, K⁺, Ca²⁺ E Mg²⁺ DE MATRIZES
DE CRAVO (*Dianthus caryophyllus* L., CARYOPHYLLACEAE) NA
CALOGÊNESE *in vitro***

Autora: TELMA KAZUMI HAYASHI

Orientador: Prof. Dr. MURILO DE MELO

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo testar a influência do estado nutricional de matrizes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) em nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio no processo de calogênese *in vitro*.

Mudas de cravo foram enraizadas em vasos contendo areia e irrigadas com água durante 15 dias. Tratamentos com 0X, $\frac{1}{4}$ X, $\frac{1}{2}$ X, 1X e 2X da concentração dos nutrientes nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio da solução nutritiva completa foram imediatamente iniciados. Ápices das plantas foram coletados aos 30, 45 e 60 dias após início dos tratamentos como fonte de explantes. Após a assepsia, explantes folha, entrenós e nó foram inoculados em meio de cultura sólido de Murashige & Skoog (1962), suplementado com 1,0 g de caseína hidrolizada, 2 μ M de cinetina, 3 μ M de 2,4-D e incubados em sala de crescimento sob condições de fotoperíodo de 16/8 horas e temperatura de 26°C $\pm$ 2.

Sintomas de deficiência ou de excesso não foram aparentes nas plantas tratadas após 60 dias de tratamento. A calogênese avaliada em massa de matéria fresca e seca foi afetada pelo estado nutricional das plantas de cravo sendo dependente do explante e duração do tratamento. Tratamento com potássio e nitrogênio afetou a calogênese em explantes nó de maneira proporcional a concentração e duração dos tratamentos. Teores de cálcio e mangnésio inferiores e superiores a aqueles da solução nutritiva completa favoreceram a calogênese em explantes entrenós e nó, a qual foi inversamente proporcional a duração do tratamento.

**EFFECT OF NUTRITIONAL STATUS ON N, K⁺, Ca²⁺ AND Mg²⁺ OF
CARNATION (*Dianthus caryophyllus* L., CARYOPHYLLACEAE) PLANTS
ON CALOGENESIS *in vitro***

Author: TELMA KAZUMI HAYASHI

Adviser: Prof. Dr. MURILO DE MELO

SUMMARY

This work was aimed to test the influence of carnation plants (*Dianthus caryophyllus* L.) nutritional status on nitrogen, potassium, calcium and magnesium on calogenesis process *in vitro*.

Carnation cuts were rooted in sand containing pots and moistened with water for about 15 days. Treatments with 0X, $\frac{1}{4}$ X, $\frac{1}{2}$ X, 1X and 2X the nitrogen, potassium, calcium and magnesium concentration of complete nutritive solutions were immediately started. Plant apexes were collected at 30, 45 and 60 days after treatment started as source of explants. After appropriate asepsis, leaf disc, internodes and node segments were inoculated on Murashige & Skoog (1962) solid culture media containing 1,0 g L⁻¹ hydrolysed casein, 2 µM kinetin and 3 µM 2,4-D and incubated in growth room at 16/8 hours photoperiod and 26°C ± 2 temperature.

No deficiency and toxicity symptoms were apparent on the treated plants after the 60 days treatments. Calogenesis evaluated based on calli fresh and dry weight was affected by carnation plants nutritional status for nutrient tested being explant and treatment duration-dependent. Potassium and nitrogen treatment affected calogenesis induced on nodal explants in a concentration and treatment duration dependent fashion. Treatment levels of calcium and magnesium lowers or higher than those of nutritive complete solution favored calogenesis induction on internodes and node explant showing a treatment inversely proportionality pattern.

1 INTRODUÇÃO

A produção de plantas *in vitro* está se tornando uma prática rotineira na agroindústria de flores em países como Holanda, França, Espanha, Japão, e em alguns países sul americanos, principalmente Colômbia e Equador. No Brasil, a micropropagação é também uma realidade no sistema de produção (Takane, 1997).

A técnica de cultura de tecidos está se popularizando como uma alternativa de propagação vegetal (Bhojwani & Razdam, 1996). As vantagens oferecidas pela propagação clonal em relação aos métodos convencionais são: a) obtenção de clones durante todo o ano; b) propagação de espécies vegetais difíceis de serem propagadas pelos métodos usuais; c) rápida multiplicação clonal de espécies vegetais valiosas; d) eliminação de vírus de estoques infectados (Gallo & Crocomo, 1995).

A técnica de cultura de tecidos vegetais oferece uma excelente oportunidade para se estudar os fatores que elucidam a totipotência celular, bem como aqueles que controlam a diferenciação citológica, histológica e organogênica de plantas (Bhojwani & Razdam, 1996).

A cultura de calos, as suspensões celulares e a cultura de protoplastos são de grande importância para o estudo de fenômenos morfogenéticos *in vitro*, seja na seleção de linhas de células mutantes, na introdução e expressão de genes e em estabelecer técnicas para a hibridação somática, bem como para a obtenção de variações genéticas nas plantas (Veasey et al., 1991). Além disso, estas técnicas trazem significantes contribuições para a indústria através da produção de compostos secundários úteis (Collin & Watts, 1983). A regeneração de plantas através da cultura de células ocorre por duas vias de desenvolvimento - a embriogênese somática e a organogênese - e qualquer uma delas pode ser diretamente a partir das células do explante ou indiretamente depois da passagem pela fase de produção de calos (Brown & Thorpe, 1986).

Na embriogênese somática, um novo indivíduo com estrutura bipolar, contendo um eixo raiz/caule, origina-se a partir de uma única célula ou conjunto de células e não apresenta conexão vascular com o tecido maternal (Haccius, 1978). A principal variável controladora da embriogênese somática é o tipo e concentração de auxina utilizada, contudo a fonte de nitrogênio do meio de cultura também é um fator de grande relevância (Brown & Thorpe, 1986). Um importante avanço em cultura de tecidos foi o desenvolvimento de técnicas para o isolamento, cultura e fusão de protoplastos. Suspensões celulares originadas de calos embriogênicos constituem uma fonte ideal para protoplastos que regeneram plantas em gramíneas (Dixon, 1985).

A organogênese, por sua vez, caracteriza-se pela obtenção de um indivíduo unipolar, que resulta em um broto, o qual possui conexão vascular com o tecido materno (Haccius, 1978).

Através da cultura de células muitas linhas de células mutantes têm sido selecionadas com resistência a aminoácidos e seu análogos, antibióticos, herbicidas, toxinas fúngicas e tolerância a estresse ambiental (Bhojwani & Razdam, 1996). Outra aplicação da cultura de células na área industrial está relacionada com a produção de metabólitos secundários. Células vegetais mantidas em suspensão líquida em biorreatores produzem produtos secundários de seu metabolismo, entre eles alcalóides, corantes e taninos (Crocomo, 1988).

Uma eficiente calogênese que resulte na geração de células morfogênicas e/ou não morfogênicas é portanto um fator que precede o sucesso de muitos projetos em biotecnologia vegetal.

As plantas cultivadas para flores de corte, como o *Cymbidium*, *Dianthus* e *Chrysanthemum*, foram as mais utilizadas na fase inicial da técnica de cultura de tecidos, porém na década de 80 a expansão ocorreu principalmente na área de ornamentais lenhosas. O prognóstico no final da década de 80 era de que mais de 3000 espécies seriam micropropagadas e a maioria se constituiria de plantas ornamentais (Debergh, 1987).

A regeneração *in vitro* de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) tem sido relatada por vários autores utilizando como explantes hipocótilo (Petru & Landa, 1974); anteras (Villa-Lobos, 1981); óvulos (Demmink et al., 1987); pétalas (Frey & Janick, 1991; Nugent et al., 1991; Messeguer et al., 1993); cálice (Frey & Janick, 1991); meristema apical (Kallak, 1996); gema axilar (Miller et al., 1991a; Altvorst et al., 1995); gema floral

(Miller et al., 1991b); segmentos caulinares (Roest & Bokelmann, 1981); folhas (Messeguer et al., 1993; Altvorst et al., 1995) e cultura de calos (Gabbrielli et al., 1995).

A técnica de cultura de tecidos para cravo é extensivamente usada na obtenção de plantas livres de vírus através da cultura de meristemas e como um método de clonagem de genótipos produtivos (Leshem, 1990).

Segundo George & Sherrington (1984), o crescimento e a morfogênese de uma cultura de células ou tecidos *in vitro* podem ser influenciados pelo genótipo (constituição genética do material cultivado), substrato (componentes do meio de cultura), reguladores de crescimento vegetal, ambiente (condições físicas nas quais a cultura é desenvolvida) e de fatores dependentes do tecido vegetal (idade, estado fisiológico, composição química, etc.).

A maioria dos meios de cultura de tecidos é ainda baseada na composição em nutrientes descrita por Murashige & Skoog (1962), um meio designado para cultura de células de *Nicotiana*. Os meios basais usados na cultura *in vitro* de cravo podem ser divididos em dois grupos. Um grupo baseado na baixa concentração de minerais é usado na eliminação de vírus, e o outro grupo, baseado na alta concentração de sais Murashige & Skoog (1962) é empregado na cultura de células e micropropagação (Mii et al., 1983).

Após os estudos de Murashige & Skoog (1962), que estabeleceram a composição mineral do meio de cultura para plantas *in vitro*, pesquisas sobre as necessidades quantitativas e qualitativas nutricionais, como nutrientes minerais, fontes de carbono, vitaminas, aminoácidos, e de fatores que afetam os níveis de nutrientes e crescimento de plantas *in vitro* têm recebido pouca atenção. Recentemente, estudos sobre nutrição em cultura de tecidos e células vegetais têm despertado certo interesse, especialmente quando a otimização dos fatores físicos de desenvolvimento *in vitro* (luz, gases, temperatura, umidade, etc.) e os tratamentos com reguladores de crescimento vegetal já não resultam em alto padrão de crescimento, que permita a viabilidade comercial da micropropagação de plantas (Leifert et al., 1995).

Os trabalhos referentes à nutrição mineral em cultura de tecidos vegetais se restringem à discussões sobre algumas características do meio de cultura (composição de alguns nutrientes, pH do meio, absorção de nutrientes). Há também relatos sobre o efeito da nutrição mineral no processo de aclimação em frutíferas micropropagadas, tais como pera (Tagliavini et al., 1993) e morango (Roux et al., 1989).

Apesar da história da cultura de tecidos de plantas ornamentais ser recente, muitos trabalhos têm sido realizados neste espaço de tempo. Entre os trabalhos referentes à cultura de tecidos de *Dianthus caryophyllus* L., não são encontrados na literatura estudos relacionando o estado nutricional de plantas matrizes com o processo de calogênese, diferenciação celular e micropropagação do explante *in vitro*.

Em vista deste fato, este trabalho teve como objetivo testar a influência do estado nutricional de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L. em nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio no processo de calogênese *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura do cravo

O cravo é uma planta ornamental do gênero *Dianthus*, família Caryophyllaceae. O gênero *Dianthus* consiste em mais de 300 espécies e o cravo cultivado pertence à espécie *Dianthus caryophyllus* L., nativa do sul da Europa e oeste da Ásia (Mii et al., 1983). Segundo Lorenzi & Souza (1999), o cravo é considerado a planta ornamental mais antiga em cultivo.

O cravo é uma planta semi-perene de haste ramificada, conduzida linearmente e apresenta folhas opostas verde-azuladas. Na haste forma-se uma flor terminal, que permite a condução do florescimento de duas formas: removendo as gemas florais formadas nas axilas das folhas, originando uma única haste contendo uma flor terminal (tipo “standard”); ou através da remoção da flor terminal para a indução do desenvolvimento de flores laterais, produzindo haste com múltiplas flores (tipo “spray”) (Lisa, 1995).

Os vírus CaMV, CRSV e CVMV são os principais causadores de danos ao crescimento da planta e qualidade das flores (Hollings & Stone, 1965). Segundo Vidalie (1983), o cravo também está sujeito a muitas doenças fúngicas e bacterianas. Importantes doenças vasculares são causadas por três fungos (*Phialophora cinerescens*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* e *Rhizoctonia solani*) e duas bactérias (*Pseudomonas caryophylli* e *Erwinia chrysanthemi*).

Comercialmente, a propagação do cravo se efetua através de estacas caulinares de 10-15 cm, obtidas de plantas matrizes livres de doenças e vírus (Leshem, 1990). A qualidade das estacas depende do estado sanitário da planta matriz, em particular no que se refere a ausência de vírus. Duas técnicas permitem a

eliminação deste patógeno: a termoterapia (tratamento por calor a 38-42°C durante três meses) e a cultura de meristemas (Vidalie, 1983).

2.2 Aspectos econômicos

Os maiores centros de produção e consumo de flores e plantas ornamentais estão localizados nos Estados Unidos, Holanda, Japão e, com produção significativa em Israel, Quênia e Colômbia (Matsunaga, 1997). As espécies comercializadas incluem crisântemo (*Dendranthema grandiflorum*), rosa (*Rosa hybrida*), gérbera (*Gerbera jamesonii*), cravo (*Dianthus caryophyllus*), tulipa (*Tulipa* spp.) e lírio (*Lilium* sp.) (Hutchinson et al., 1992).

A exploração econômica de flores e plantas ornamentais é muito recente no Brasil e tem se intensificado nos últimos anos devido, principalmente, à alta rentabilidade. Atualmente o mercado brasileiro de flores é um subsetor da agricultura que movimenta aproximadamente US\$ 1,1 bilhão ao ano, com um consumo anual per capita de US\$ 7,0 (Okuda, 2000).

O Estado de São Paulo é o principal centro produtor do Brasil, responsável por cerca de 70% da produção nacional de flores e plantas ornamentais (Franco, 2000; Okuda, 2000). O suporte da comercialização da produção é dado principalmente por quatro categorias distintas de sistema de distribuição atacadista representadas pela Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), pelo Mercado Permanente de Flores e Plantas Ornamentais da Central de Abastecimento S/A Campinas (CEASA), por um sistema de leilão através do Veiling da Cooperativa Agropecuária Holambra (Franco, 2000), e pela FLORANET, responsável pela comercialização eletrônica virtual de flores e plantas através da *internet* (Smorigo, 2000).

Atualmente, as cidades paulistas que mais se destacam na produção de flores são Holambra, Atibaia, Campinas e Indaiatuba (Pimentel, 2000). Em 1991, os municípios de Cotia, Atibaia, São Paulo, Jaguariúna e Mogi das Cruzes eram os principais produtores de cravo (Olivetti et al., 1994).

O surgimento do Mercosul cria maiores perspectivas para o crescimento das exportações, entretanto, cabe ao setor produtivo o aprimoramento de sua eficiência, reduzindo custos e estabelecendo parâmetros qualitativos e quantitativos para a produção, pois o mercado tornou-se mais exigente quanto à qualidade e preços. As tecnologias de ponta como fisiologia de pós-colheita, plasticultura e a biotecnologia são instrumentos importantes na padronização e qualidade da produção, colocando as flores e plantas ornamentais como uma opção promissora na agricultura do Estado de São Paulo (Olivetti et al., 1994).

As flores de corte representam o principal segmento da produção de flores e plantas ornamentais, e as mais cultivadas são o crisântemo, rosa, gipsofila, gladiolo, cravo, estrelícia, lírio, entre outras (Franco, 2000).

Com relação ao cravo, houve, no período de 1983 a 1991, uma tendência decrescente na quantidade comercializada (Olivetti et al., 1994). Dois fatores podem estar associados à esta redução na comercialização de cravo: um devido à mudança de hábito por parte do consumidor pela diversificação de oferta de flores (Hoogendoorn & Sparnaaij, 1987), e o outro fator está associado à tecnologia de produção, mais propriamente relacionado à dificuldade em adequar uma haste resistente ao tombamento durante o seu ciclo produtivo. Tal fato acarreta problemas na condução da cultura resultando em aumento de custo devido à necessidade de apropriados tratamentos culturais (Olivetti et al., 1994).

De acordo com Kerbauy (1997), a micropropagação de matrizes de plantas ornamentais, tais como gérbera, cravo, tulipa e orquídea, tem permitido a compatibilidade de demandas específicas do mercado interno e externo com atributos importantes como época de floração, coloração, tamanho e forma das flores, número de flores por planta, comprimento e resistência das hastes florais, tamanho e vigor das plantas. A multiplicação *in vitro* em larga escala de plantas de importância econômica tem resultado na instalação de verdadeiras biofábricas comerciais, baseadas no princípio da linha de produção.

2.3 Nutrição mineral

A obtenção de uma produção satisfatória de cravo, tanto qualitativa como quantitativamente, depende de um adequado conhecimento e manejo das exigências nutricionais da planta. O balanço entre os elementos nutricionais é indispensável para que o cultivo alcance o máximo potencial de crescimento, desenvolvimento e floração (Amézquita et al., 1993).

O manejo nutricional é um dos métodos que juntamente com outras formas de controle pode reduzir o surgimento de doenças (Burbano et al., 1990), como por exemplo, a doença ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Amézquita et al., 1993).

Fernandes et al. (1989) analisaram, separadamente, caules, folhas e flores de cravo de diversas cultivares e relataram que os teores percentuais de macronutrientes encontrados nas diferentes partes do cravo apresentaram maior oscilação nas folhas. Segundo os mesmos autores, uma planta de cravo extrai aos 115 dias de idade 434 mg de nitrogênio, 81 mg de fósforo, 1026 mg de potássio, 348 mg de cálcio, 90 mg de magnésio e 56 mg de enxofre.

O conteúdo dos nutrientes nas folhas de cravo é muito variável, depende da variedade da planta, estágio de desenvolvimento e época de coleta do material. Muitos autores têm sugerido valores entre 30-39 g kg⁻¹ de N; 2-3,5 g kg⁻¹ de P; 20-63 g kg⁻¹ de K⁺; 10-20 g kg⁻¹ de Ca²⁺ e 2-6 g kg⁻¹ de Mg²⁺ como parâmetros para o desenvolvimento satisfatório do cravo (Winsor & Adams, 1987).

Segundo Winsor & Adams (1987), o diagnóstico das desordens nutricionais em cravo se caracteriza por: N - a planta deficiente apresenta entrenós mais curtos, resultando em uma planta mais baixa; a folha é pequena e estreita, com coloração verde pálido a amarelado, tornando-se marrom a partir de seu ápice e margem, com descoloração avermelhada a marrom visível na zona marginal. As flores são pequenas e pouco desenvolvidas; K⁺ - os sintomas de deficiência manifestam-se inicialmente nas folhas, que se tornam marrom e secam, a partir do ápice e curvam para baixo. As gemas pequenas e páleas secam e não abrem, se a flor aparece sua cor é pálea; Mg²⁺ - a planta deficiente possui haste fina e fraca, as folhas apresentam estrias, isto é, tornam-se amarelas, mas somente as nervuras permanecem verde claro; Ca²⁺ - apesar

de aparentarem saudáveis, as flores de plantas deficientes apresentam estame e estilete proeminentes, pétalas de tamanho irregular com margens descoloridas. A parte aérea da planta permanece curta quando a deficiência de Ca^{2+} é mais severa.

As deficiências de N e K^+ afetam a produção e a qualidade da flor de cravo, reduzem a produção de matéria seca e a extração de outros nutrientes pela planta. A deficiência de N está relacionada com o parâmetro de produção enquanto a deficiência de K^+ afeta o parâmetro qualidade. A deficiência de P provoca redução na produção de flores e a de Ca^{2+} torna a gema fraca. Ambas deficiências retardam a colheita das flores. A deficiência de Mg^{2+} provoca o encurtamento da parte aérea e aumenta a porcentagem de flores pequenas enquanto que a deficiência de S aumenta a porcentagem de flores fracas (Medina, 1992).

2.3.1 Função do nitrogênio na planta

O nitrogênio é constituinte de muitas moléculas celulares importantes, incluindo aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos (Mengel & Kirkby, 1987), coenzimas (Epstein, 1972), clorofila e certos fitorreguladores (ácido indolil acético), de modo que a ocorrência de sintomas de deficiência de nitrogênio resultam no crescimento lento das plantas, e clorose geral das folhas (Hopkins, 1995).

As plantas absorvem nitrogênio da solução do solo na forma de nitrato e, em poucos casos, como amônio. Uma vez na planta, o nitrato é reduzido a amônio pelas atividades das enzimas redutase do nitrato e redutase do nitrito, antes de ser incorporado em aminoácidos, os quais seguem rotas diferentes como a síntese de proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, entre outras moléculas orgânicas nitrogenadas (Marschner, 1995; Taiz & Zeiger, 1998).

A síntese das enzimas redutases de nitrato e nitrito e da permease, responsáveis pela assimilação do nitrogênio nítrico, é induzida pelo nitrato, enquanto que os íons amoniacais mantêm o balanço cátion-ânion (Marschner, 1995) e ativam certas enzimas as quais o potássio é normalmente o catiônico ativador (Epstein, 1972).

O amônio, uma vez absorvido, pode ser utilizado imediatamente na síntese de aminoácidos e de outros compostos que contêm N reduzido. A assimilação do amônio requer grande demanda por esqueletos carbônicos e, se a fotossíntese não for suficiente, ocorre exaustão dos carboidratos. A assimilação é geralmente rápida, de modo que não ocorre acúmulo de amônio no tecido vegetal (Epstein, 1972).

O nitrogênio nítrico, por sua vez, tem que ser reduzido antes de sua assimilação. O clima, o estágio de crescimento, a espécie vegetal e a disponibilidade de outros nutrientes têm implicações no ajustamento metabólico à absorção dos íons amoniacais e nítricos (Epstein, 1972). Portanto, o bom desempenho fisiológico e bioquímico do nitrogênio parece estar associado à nutrição satisfatória da planta em potássio, o qual tem função na manutenção da relação C/N (carbono/nitrogênio) ótima nas células (Flowers & Läuchli, 1983), atuando na regulação de enzimas fotossintéticas e oxidativas dos carboidratos.

Sabe-se que o tipo de forma iônica do nitrogênio afeta o crescimento celular e a absorção de nutrientes pela alteração do balanço cátion-ânion, alterando o acúmulo de ânion orgânico, e conseqüentemente, afetando os valores do pH do meio e do citosol (Marschner, 1995).

2.3.2 Função do potássio na planta

O potássio apresenta papel importante nos processos de transporte da membrana (Clarkson & Hanson, 1980), no controle da abertura e fechamento dos estômatos (Hopkins, 1995), na regulação do potencial osmótico de células vegetais, e também é ativador de muitas enzimas envolvidas na respiração (Moorby & Besford, 1983) e fotossíntese (Marschner, 1995).

Plantas bem nutridas com potássio apresentam maior síntese de material para a formação de parede celular. Frequentemente, a parede celular é mais espessa devido à maior deposição de celulose e compostos relativos, oferecendo maior estabilidade ao tecido vegetal, aumentando a sua resistência às injúrias (Beringer & Nothdurft, 1985).

O potássio atua no controle osmótico das células. O aumento irreversível do volume celular pela divisão e expansão celular envolve o requerimento por potássio para manter o potencial osmótico das células (WYN Jones et al., 1979).

A concentração de potássio no citoplasma é de aproximadamente 100 mM e corresponde a 5-10 vezes a concentração de potássio no vacúolo (Flowers & Läuchli, 1983). O potássio atua na regulação do pH citoplasmático (WYN Jones & Pollard, 1983). Altas concentrações de K^+ no citoplasma e no cloroplasto contribuem para estabilizar o pH entre 7 e 8 nestes compartimentos, valores esses, ótimos para reação das enzimas fotossintéticas (Marschner, 1995).

O potássio se caracteriza por ser ativador de grande número de enzimas, incluindo aquelas envolvidas na oxidação de carboidratos (Besford, 1978), principalmente dos grupos das quinases (WYN Jones & Pollard, 1983), sintetases, oxidoredutases e desidrogenases, estando estreitamente relacionadas com os processos de assimilação de CO_2 e de N, favorecendo a síntese de proteínas (Flowers & Läuchli, 1983), amido (Hopkins, 1995), e a síntese, translocação e armazenamento de açúcares (Malavolta & Crocomo, 1982).

O efeito do potássio na atividade enzimática está relacionado com a mudança na conformação da molécula de proteína (Marschner, 1995), aumentando a exposição dos sítios ativos para ligação com o substrato. Segundo Malavolta et al. (1997), talvez uma das razões para as altas exigências seja a necessidade da manutenção de altas concentrações potássicas no citoplasma para garantir a atividade enzimática.

A deficiência de potássio pode provocar distúrbios metabólicos, resultando na redução nos níveis celulares de amido, devido ao aumento da atividade da enzima amilase (Lavon, 1995); no acúmulo de carboidratos solúveis, atribuído pelo decréscimo da atividade de enzimas dependentes de potássio que oxidam carboidratos, como é o caso da piruvato quinase (Evans & Sorger, 1966); causando redução da concentração de ácidos orgânicos; ocasionando acúmulo de compostos nitrogenados livres, tais como alguns aminoácidos, amidas e amônia, além de certas aminas como putrescina, agmatina, N-carbamil-putrescina (Malavolta & Crocomo, 1982).

2.3.3 Função do cálcio na planta

O cálcio é essencial para manter a integridade estrutural das membranas e das paredes celulares (Malavolta et al., 1997). Apesar de não ser constituinte das membranas celulares, o cálcio é de fundamental importância na sua permeabilidade (Epstein, 1972), transporte e na manutenção da integridade celular (Marschner, 1995). O cálcio regula processos celulares como crescimento polarizado, mitose e fluxos ou correntes citoplasmáticas (Hepler & Wayne, 1985).

A concentração de cálcio livre no citosol é baixa (aproximadamente 0,01 a 1,0 μM) quando comparada com a do vacúolo e de outras organelas (Marmé, 1983). A maior parte do Ca^{2+} presente no tecido vegetal está localizada na mitocôndria, retículo endoplasmático (Clarkson & Hanson, 1980), apoplasto e no vacúolo (Mengel & Kirkby, 1987). A manutenção da baixa concentração de cálcio é garantida pela ação de ATPases transportadoras de Ca^{2+} localizadas no plasmalema, as quais bombeiam o cálcio do citosol para o apoplasto e vacúolo (Malavolta et al., 1997). A atividade das ATPases, por sua vez, é modulada pela calmodulina, que combina com o cálcio, formando um complexo envolvido na regulação dos processos metabólicos (Taiz & Zeizer, 1998).

O aumento da concentração de cálcio no citosol ativa a calmodulina, que por sua vez, ativa numerosas enzimas por indução alostérica. A calmodulina ativa também a ATPase, que bombeia o cálcio de volta aos seus reservatórios, reduzindo o nível de cálcio no citosol e conseqüentemente diminuindo a ativação enzimática efetuada pela calmodulina (Malavolta et al., 1997).

O cálcio é considerado mediador de muitas reações químicas e bioquímicas, estando associado com os mecanismos de crescimento e desenvolvimento da planta (Marschner, 1995). Segundo Hepler & Wayne (1985), o crescimento vegetal depende do cálcio e os processos de divisão e alongamento celular são afetados pela concentração deste íon, de modo que a deficiência de cálcio inibe o crescimento e promove desordens fisiológicas, uma vez que a concentração de cálcio citosólico livre regula diversos eventos intracelulares, como crescimento, desenvolvimento, metabolismo e outras funções mediadas por fitorreguladores.

Plantas deficientes em cálcio apresentam células multinucleadas, mitose anormal, espessamento da parede celular das fibras e dos tecidos do colênquima, vacuolização prematura, células com formato irregular, redução da lignificação, parede celular frágil, alteração no tamanho da célula e na diferenciação celular (Bould et al., 1983).

O cálcio tem papel limitado como cofator enzimático. O efeito inibitório do cálcio em reações de respiração e metabolismo intermediário *in vitro* demonstra que a sua atividade *in vivo* deve ser muito baixa (Clarkson & Hanson, 1980).

2.3.4 Função do magnésio na planta

Nos vegetais o magnésio é o átomo central do anel tetra pirrólico da molécula de clorofila (Hopkins, 1995), representando aproximadamente 10% do magnésio total foliar (Epstein, 1972).

O magnésio ativa mais enzimas do que qualquer outro elemento. É cofator de quase todas as enzimas que atuam sobre substratos fosforilados (Mengel & Kirkby, 1987), sendo de grande importância no metabolismo energético (Epstein, 1972). A ativação não é altamente específica, o manganês pode muitas vezes substituí-lo (Bould et al., 1983), e em menor extensão, outros catiônicos divalentes. O Mg^{2+} ativa outras enzimas não implicadas na transferência de fosfato (Epstein, 1972), incluindo as reações de transferência de nucleotídeos, grupos carboxílicos, e atividades de algumas desidrogenases, mutases e liases (Clarkson & Hanson, 1980).

O magnésio tem papel específico na ativação de enzimas envolvidas na respiração e fotossíntese (Taiz & Zeiger, 1998). Enzimas dependentes de ativação por magnésio são importantes na fotossíntese, como por exemplo a ribulose biscofosfato carboxilase, enolase e piruvato fosfato diquinase (Bould et al., 1983).

O magnésio está envolvido na síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico), RNA (ácido ribonucleico) e de compostos orgânicos como carboidratos, lipídeos e proteínas (Marschner, 1995). O magnésio também tem função essencial na agregação das subunidades ribossômicas. O magnésio parece estabilizar as subunidades na configuração necessária para a síntese de proteínas (Mengel & Kirkby, 1987).

Quando o nível de magnésio é deficiente, ou na presença de níveis excessivos de potássio (Sperrazza & Spremulli, 1983), as subunidades ribossômicas se dissociam e a síntese de proteína cessa. O magnésio também é necessário para a RNA polimerase e para a formação de RNA no núcleo. A síntese de RNA imediatamente cessa em resposta a deficiência de magnésio, entretanto, é rapidamente reiniciada após adição de magnésio (Marschner, 1995).

2.4 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos de plantas é a expressão utilizada para designar a cultura *in vitro* de células, tecidos e órgãos de plantas, que além de proporcionar variação genética, condição essencial para a seleção de genótipos superiores, amplia os conhecimentos para a compreensão dos fenômenos bioquímicos e fisiológicos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas (Gallo & Crocomo, 1995).

Segundo Grout (1990), as maiores vantagens da cultura de meristemas são a propagação clonal *in vitro* e o potencial de remoção de vírus, bactérias e fungos de plantas infectadas.

A cultura de meristemas é um método muito popular na erradicação de vírus em *Dianthus caryophyllus* L. (Debergh et al., 1990). Dentre os fatores importantes na regeneração de plantas livres de vírus, destacam-se as condições de desenvolvimento da planta matriz (estado fitossanitário, fisiológico e nutricional), tipo e tamanho do explante, meio e condições de cultura, estiolamento, quebra da dominância apical, influência sazonal, eletroterapia, quimioterapia e termoterapia (Torres et al., 1998).

Vários autores utilizaram a cultura de meristemas para a propagação de cravo *in vitro* (Petru & Landa, 1974; Shabde & Murashige, 1977; Mii et al., 1983) desde que Stone (1963) introduziu a cultura de meristemas para a micropropagação de cravo. Hackett & Anderson (1967) utilizaram desta técnica para a multiplicação de cravo, obtendo variação na cor da flor, sugerindo uma disrupção de quimeras.

A manutenção do crescimento e da organogênese de meristema apical de cravo desprovido de primórdios foliares requer auxina e citocinina exógena, importantes na sustentação da divisão celular e crescimento da região meristemática (Shabde & Murashige, 1977).

A cultura de calos, bem como outros sistemas de cultura de células, está associada a problemas de instabilidade genética, resultando em variações fenotípicas (Dodds & Roberts, 1985), as quais são importantes na obtenção de plantas com alta variabilidade genética (Siqueira, 1986).

Segundo Stafford & Warren (1991), o estabelecimento da cultura de calos a partir de explantes (raiz, caule, folha, flor, tecidos, etc.) é dividido em três etapas: (1) indução (ativação do metabolismo para a desdiferenciação e divisão celular); (2) divisão (as células dividem-se ativamente em células de tamanho menor); e (3) diferenciação (a célula torna-se maior, vacuolizada e a taxa de divisão diminui, e então há o equilíbrio entre a expansão e divisão celular).

Conforme Handro & Floh (1990), a indução é uma fase preparatória, com ativação do metabolismo, que culmina com a divisão celular. Nem todas as células do explante respondem uniformemente ao novo ambiente; na maior parte dos casos, e principalmente quando os explantes são homogêneos, somente as células mais externas são induzidas a dividir-se, resultando numa camada periférica ativa. Posteriormente, ocorre uma diminuição nas divisões da camada superficial, ocorrendo mais internamente divisões e diferenciações que originam estruturas nodulares que contêm traqueídes.

O crescimento dos calos pode variar dependendo de fatores tais como posição original do explante na planta e condições de crescimento *in vitro*. O fornecimento de reguladores de crescimento vegetal é recomendado na indução de calos, porém a resposta depende do genótipo e do conteúdo hormonal endógeno do explante (Pierik, 1987).

O crescimento, diferenciação e metabolismo celular são afetados pelos reguladores de crescimento vegetal (Stafford & Warren, 1991). O balanço entre a concentração de auxina e citocinina é importante no estabelecimento da cultura e manutenção de calos. A formação da raiz é induzida em meio com alta concentração de auxina e baixa de citocinina, enquanto que a baixa concentração de auxina e alta de

citocinina favorecem a formação da parte aérea adventícia, e geralmente o calo regenera mais raiz adventícia do que parte aérea adventícia (Pierik, 1987).

Indução de calos a partir de explante caulinar de cravo foi obtida no meio de Murashige & Skoog (1962), suplementado com 1 mg L^{-1} de 2,4-D (ácido 2,4-dicloro fenoxiacético) e 1 mg L^{-1} de cinetina, sendo o maior número de calo obtido em presença de 1 mg L^{-1} de NAA e 1 mg L^{-1} de cinetina (Radojevic et al., 1990). Entretanto, após 6 meses de cultura contínua estes calos perderam o potencial organogênico. Em cálice, nós, entrenós e folhas a organogênese foi esporádica e somente ocorreu a partir de calos (Frey & Janick, 1991).

Muitos são os fatores que influenciam o comportamento do explante no meio de cultura, incluindo o órgão que serve como fonte de tecido, a idade fisiológica e ontogenética do órgão, o tamanho do explante e acima de tudo a qualidade da planta doadora (Thorpe & Patel, 1984).

Engvild (1972) estabeleceu a cultura de suspensão a partir de medula de caule de cravo usando 2,4-D. Em estudos posteriores, Crouch & Staden (1993) obtiveram resultados similares, concordando com Engvild (1972) quanto a aplicação da cultura de calos e suspensão celular nos estudos bioquímicos.

A importância do cravo na floricultura estimula os estudos visando a maximização dos fatores ligados a propagação de plantas. A produção deve ser rápida e viável em função das exigências do mercado. Entretanto, é necessário a geração de novas técnicas, como a regeneração adventícia e a embriogênese somática, para alcançar uma alta escala produtiva em um tempo limitado (Ruffoni & Massabo, 1992).

Frey et al. (1992) relataram que embriões somáticos podem ser induzidos a partir de entrenós de *Dianthus caryophyllus* L., porém, muitos desses embriões apresentaram-se anormais com ausência de meristemas apical ou radicular e em poucos casos, os embriões desenvolveram-se em plantas viáveis em condições *ex vitro*.

Ruffoni & Massabo (1992) obtiveram plantas a partir de suspensão celular de *Dianthus caryophyllus* L., porém não souberam determinar se esta regeneração foi devido à embriogênese somática ou a uma simples regeneração da parte aérea a partir de agrupamentos diferenciados de células, caracterizando a regeneração por organogênese.

De acordo com Frey et al. (1992), o protocolo para a indução de embriogênese somática em cravo inclui a indução de calos em meio Murashige & Skoog (1962) líquido suplementado com 3,0 μM de 2,4-D, seguido da transferência para o meio basal sem 2,4-D para o desenvolvimento do embrião.

Choudhary & Chee (1995) descreveram a regeneração de plantas de cravo via embriões somáticos a partir da indução de calos em meio MS com 2,4-D e mantido no escuro, seguido da transferência para um meio sem regulador de crescimento vegetal para o desenvolvimento dos embriões em suspensão.

Yantcheva et al. (1998) obtiveram embriogênese somática direta e regeneração de planta a partir de folha de cravo em meio líquido suplementado com 1 mg L^{-1} de 2,4-D e 0,2 mg L^{-1} de BAP (benzil amino-purina). Segundo os mesmos autores, as plantas regeneradas de embriões somáticos foram aclimatadas com sucesso e possuíam fenótipo normal.

Engvild (1972) obteve regeneração de raiz em meio contendo alta concentração de IAA (ácido indolil acético) ou NAA (ácido naftaleno acético), no entanto, a formação de partes aéreas ou embriões apresentaram resultados negativos.

Por outro lado, Petru & Landa (1974) verificaram que a formação de partes aéreas ocorreu em calos obtidos a partir de hipocótilos isolados de cravo e cultivados em meio MS modificado, suplementado com 22 μM de IAA e 11,8 μM de cinetina.

A organogênese em cravo pode ser influenciada pelo tamanho e fonte de explante, posição do explante na planta, genótipo e reguladores de crescimento vegetal. Shabde & Murashige (1977) relataram que em ápices caulinares de cravo o requerimento por reguladores de crescimento vegetal diferiram com o tamanho do explante.

Conforme Miller et al. (1991a), o uso de folhas e caules de cravo como explantes não teve sucesso na regeneração de parte aérea adventícia devido à senescência destes explantes em presença de benziladenina, cinetina e zeatina, enquanto que gemas axilares apresentaram regeneração superior. Esta falta de sucesso na regeneração a partir de folhas já tinha sido relatada anteriormente por Roest & Bokelmann (1981).

Nugent et al. (1991) observaram que em explante caulinar de cravo, a capacidade morfogênica foi determinada pelo estágio de desenvolvimento do explante,

sendo que os segmentos caulinares mais jovens apresentaram maior porcentagem de formação de parte aérea adventícia.

Conforme Altvorst et al. (1992), as folhas mais jovens, localizadas logo abaixo do meristema apical, apresentam melhores resultados de regeneração, recomendando-se portanto o uso dos três pares superiores de folhas. Segundo os mesmos autores, o maior número de parte aérea regenerada foi obtido em meio Murashige & Skoog (1962) contendo 0,9 mg L⁻¹ de BAP e 0,3 mg L⁻¹ de NAA.

Messeguer et al. (1993) relataram que somente segmentos basais de folhas geraram parte aérea quando cultivados em meio Murashige & Skoog (1962), suplementado com 0,01 mg L⁻¹ de NAA e 1 mg L⁻¹ de BAP.

Altvorst et al. (1995) verificaram que usando gemas axilares como explantes, a eficiência de regeneração de parte aérea foi independente do tamanho da gema e de sua posição original na planta. Em contraste, a regeneração a partir de caule e folha como explantes foi dependente de sua posição original na planta. Kallak et al. (1996) observaram que as respostas morfogênéticas em culturas de meristemas apicais de cravo são afetadas pelos reguladores de crescimento vegetal e pelo genótipo.

O desenvolvimento de folhas vitrificadas é um problema relatado em culturas de cravo *in vitro*. O fenômeno da vitrificação é descrito como desordem morfológica e fisiológica, que freqüentemente afeta plantas herbáceas e lenhosas durante a regeneração vegetativa *in vitro* (Leshem et al., 1988). Werker & Leshem (1987) descreveram as seguintes características anatômicas de plantas vitrificadas de cravo, induzidas por excesso de auxina, destacando-se hipertrofia celular, perda das características meristemáticas, total diferenciação do ápice caulinar e paredes celulares defeituosas.

A vitrificação é atribuída à umidade, potencial de água, reguladores de crescimento vegetal e níveis de nitrogênio e cálcio (Cuzzuol, 1993). A freqüência e a extensão da vitrificação podem ser minimizadas através do aumento da concentração de agar no meio de cultura ou pela redução da umidade relativa da cultura (Leshem, 1983).

2.5 Fatores nutricionais que afetam a cultura de tecidos

A cultura de células e tecidos *in vitro* é largamente aplicada na propagação comercial de mudas e em estudos genéticos, bioquímicos e fisiológicos. A escolha da composição orgânica e mineral do meio de cultura é importante para o sucesso desta técnica. É importante citar que os nutrientes necessários para a diferenciação celular e crescimento dos explantes têm que estar presentes no meio em quantidade suficiente para sustentar o período de cultura (Mezzetti et al., 1991).

O desequilíbrio nutricional pode causar crescimento anormal. A distribuição e composição dos elementos químicos no explante, além de ser influenciada pela sua disponibilidade no meio de cultura, também pode estar relacionada com as condições de cultivo das matrizes que lhe deram origem e com as alterações nas atividades metabólicas nos explantes *in vitro* (Mezzetti et al., 1991). Alto nível de amônio (Daguin & Letousé, 1987) e baixo nível de potássio (Pasqualetto et al., 1988) estão envolvidos na vitrificação de tecidos vegetais.

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão do desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como a fotossíntese, possam ser drasticamente reduzidos pelas condições de cultivo, condição do meio de cultura e pelo estado de diferenciação das células. Portanto, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro* (Caldas et al., 1998).

A concentração ótima de muitos nutrientes, incluindo NO_3^- , PO_4^{3-} , e K^+ , em plantas cultivadas *in vivo* é muito mais baixa do que as concentrações encontradas em meio de cultura de tecidos, sugerindo que a concentração de nutrientes utilizada em propagação *in vitro* é muito alta para o crescimento ideal das plantas. Entretanto, experimentos têm demonstrado que *in vitro* o meio de cultura pode ser rapidamente exaurido de nutrientes, incluindo NO_3^- , PO_4^{3-} , K^+ e Mg^{2+} , enquanto que outros nutrientes como o Ca^{2+} são absorvidos de forma mais lenta (Lumsdem et al., 1990).

O N, K^+ e Mg^{2+} são transportados no xilema e redistribuídos principalmente no floema, em processos relativamente rápidos, de modo que os sintomas típicos de

carência começam a aparecer nas folhas mais velhas, enquanto que o cálcio é relativamente imóvel e os sintomas de deficiência aparecem nas folhas mais jovens (Hopkins, 1995; Malavolta et al., 1997). De forma geral, o potássio e o magnésio são altamente móveis entre as diferentes partes dos explantes de *Actinidia deliciosa in vitro* (calos, caule e folhas), movendo-se em direção a região de crescimento mais ativo, sendo nos calos o principal local de acúmulo destes nutrientes (Mezzetti et al., 1991).

De acordo com Dussert et al. (1995a), em todas as técnicas *in vitro* a escolha da composição orgânica e mineral do meio de cultura determina o sucesso do método. Além disso, para o processo de diferenciação celular, requerimentos específicos dependem da espécie estudada, da natureza do tecido e de seu estado fisiológico.

2.5.1 Nitrogênio

O nitrogênio difere dos demais macronutrientes pelo fato de apresentar-se na forma de cátion (amônio) e ânion (nitrito e nitrato). O efeito destas diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e desenvolvimento de cultura de tecidos é marcante (Caldas et al., 1998).

O crescimento e a morfogênese na cultura de tecidos são extremamente influenciados pela disponibilidade e pela forma de como o nitrogênio é fornecido (George & Sherrington, 1984). O nitrato é considerado geralmente a fonte de nitrogênio mais absorvida, no entanto, nitrogênio reduzido, como o amônio, mostra-se necessário, pois é a forma com o que o nitrogênio é assimilado nos ácidos orgânicos (George & Sherrington, 1984).

A absorção do nitrato requer um pH ácido, tornando o meio gradualmente menos ácido durante a absorção, enquanto que a absorção de amônio resulta na excreção de íons de hidrogênio para o meio, tornando-o ácido, e conforme o pH cai a absorção de amônio é inibida. Portanto, a relação entre nitrato/amônio forma um sistema tampão no meio de cultura, aumentando a absorção total de nitrogênio (George & Sherrington, 1984).

Uma vez na célula, o nitrato tem que ser reduzido a amônio antes de ser utilizado biossinteticamente. Esta conversão depende das atividades das enzimas

redutase do nitrato e do nitrito, que é regulada diretamente pelos níveis de íons nitrato no meio (George & Sherrington, 1984).

Conforme George & Sherrington (1984), o suprimento de nitrogênio reduzido parece ser benéfico em processos envolvidos na divisão celular, como na formação da parede celular e na síntese de fatores endógenos, em que o nitrogênio reduzido estimula a divisão celular e diminui o requerimento por citocinina.

A indução do processo de embriogênese requer um intenso metabolismo de nitrogênio e substancial atividade celular (Montoro et al., 1995a). Em calos de *Hevea brasiliensis* a indução da embriogênese somática requer nitrato, sendo que a absorção amônio/nitrato é influenciada pelos reguladores de crescimento vegetal do meio de cultura (Montoro et al., 1995b). Em *Cocus nucifera* a obtenção de calos embriogênicos uni e pluricelulares requer altas concentrações de NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e sacarose (Dussert et al., 1995b).

2.5.2 Potássio

Segundo Leigh & WYN Jones (1984), concentração de potássio de aproximadamente 100 a 200 mM deve ser mantida no citoplasma para permitir um crescimento e multiplicação normal da célula. Na célula vegetal o potássio é importante na neutralização de ácidos orgânicos e macromoléculas de grupos aniônicos, e na redução do potencial água.

O potássio no vacúolo, responsável em parte por manter o turgor celular, pode ser substituído por outro cátion, como o sódio ou magnésio, porém quando a concentração no vacúolo está abaixo de seu nível crítico, a concentração de potássio no citosol é reduzida, e como resultado, os processos metabólicos dependentes de K^+ declinam, reduzindo ou cessando o crescimento celular (Leigh & WYN Jones, 1984). Em relação a outros íons, a absorção do potássio é estimulada na presença de cálcio e inibida na presença de magnésio (Marschner, 1995).

Segundo Caldas et al. (1998), o potássio é adicionado no meio como íon acompanhante do nitrato, fosfato ou, em alguns casos, do cloreto. O íon exerce suas funções metabólicas e bioquímica na planta, e nas células *in vitro*, como íon livre, sem incorporação em compostos orgânicos, tornando o seu metabolismo muito simples.

Ben-Hayyim et al. (1987), estudando o papel do potássio na manutenção do crescimento de cultura de células de *citrus*, verificaram que a concentração interna de potássio determina o potencial de crescimento de células cultivadas em meio contendo várias concentrações de sais, tais como NaCl e CaCl₂.

Através de estudos sobre o efeito de K₂SO₄ e KCl na absorção e no crescimento em cultura de calos de mirtilo, Muralitharam et al. (1992) observaram que em cultura de calos tolerante ao sal, o crescimento halofítico foi pronunciado. Segundo os mesmos autores, esse crescimento pode ter sido em função do aumento da absorção de íons, através da redução do potencial água, e não pela adaptação a estes sais.

A deficiência de potássio pode promover o acúmulo de certas aminas, decorrente da maior absorção de N, Mg²⁺ e Ca²⁺ pela planta. As poliaminas, putrescina, espermidina e espermina são amplamente distribuídas na natureza, desempenhando importante papel em eventos celulares (Schons & Brasil, 1995). Sabe-se que elevados níveis de poliaminas são necessários durante a embriogênese somática de cenoura em cultura de tecidos (Feirer et al., 1984). Segundo Kaur-Sawhney et al. (1982), os níveis de poliaminas livres e conjugadas aumentaram drasticamente durante a diferenciação e regeneração de plantas derivadas de células do mesofilo de *Vigna* em cultura de protoplastos.

Estudando os teores de poliaminas durante as diferentes fases da embriogênese somática de cenoura em suspensão celular, Schons & Brasil (1995) sugeriram que a redução dos níveis de espermidina e espermina em relação a putrescina foi devido à intensa utilização de espermidina e espermina no processo de divisão e diferenciação celular. Estes mesmos autores ainda observaram que a putrescina não parece estar envolvida diretamente no processo embriogênico, tendo como função apenas a síntese de espermidina e espermina.

Em cultura de cenoura selvagem (*Daucus carota* L.), Brown et al. (1976) concluíram que apesar do número máximo de embriões somáticos produzidos ser dependente da fonte de N, o aumento da concentração de K⁺ no meio aumentou o número de embriões produzidos em todas as fontes de N. A concentração de potássio necessária para a máxima indução e crescimento de calos (1 mM) foi menor que a necessidade para a máxima embriogênese (20 mM).

Chée et al. (1992) observaram que altas concentrações de potássio promovem o crescimento de calos embriogênicos em batata doce e recomendam o uso de 20 mM de NH_4^+ e 50 mM de K^+ para o crescimento de calos embriogênicos, e 10 mM de NH_4^+ e 20 mM de K^+ para a produção de embriões.

2.5.3 Cálcio

O cálcio tem função na regulação das atividades hormonais que resultam na alongação, divisão e diferenciação celular (Marmé, 1983; Bergmann, 1992). A deficiência de cálcio resulta no aumento do número de células não diferenciadas sem estabilidade estrutural (Bergmann, 1992).

Há evidências de que em células meristemáticas a auxina induz secreção de H^+ em presença de Ca^{2+} e que a auxina está associada ao metabolismo da pectina e na dissolução da lamela média (Torrey & Reinert, 1961). Estas evidências são de que as auxinas atuam na remoção de íons de cálcio responsáveis pela ligação entre os grupamentos carboxílicos de polímeros da parede celular, e no aumento de radicais metil nas substâncias pécticas da parede. A metilação dos grupamentos carboxílicos das moléculas de pectina adjacentes, sob efeito da auxina, promove a remoção das pontes de cálcio da parede celular, resultando no seu afrouxamento (Castro, 1979).

No sistema trifosfato inositol, provavelmente um mensageiro secundário que opera em plantas, o complexo receptor de auxina, ativa a fosfolipase C, uma enzima da membrana plasmática (Guern, 1987). Este complexo pode atuar através de uma proteína G, apesar da existência da proteína G ser ainda incerta em membranas de células vegetais. A fosfolipase C catalisa a conversão do fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) em inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). Ambos IP_3 e DAG podem funcionar como mensageiros secundários. No citoplasma o IP_3 estimula a liberação de cálcio do vacúolo e a formação de um complexo Ca^{2+} - calmodulina, que pode estimular a resposta diretamente ou através da ativação de quinases. Simultaneamente o DAG ativa a proteína quinase C, que fosforila outra proteína pela transferência de um grupo fosfato do ATP (Hopkins, 1995).

A concentração de cálcio citosólico modula o metabolismo celular através da fosforilação/desfosforilação de diferentes proteínas (Guern, 1987).

Conforme Castro (1997), a auxina atua na síntese e/ou ativação de mensageiros secundários e na secreção de prótons H^+ , através da membrana plasmática, promovendo acidificação em compartimento da parede celular. Esta acidificação, por sua vez, induz a síntese ou ativação de enzimas, que podem romper e refazer ligações entre as microfibrilas de celulose da parede celular, aumentando a plasticidade, possibilitando que potenciais de pressão elevados levem ao crescimento celular. A acidificação também promove a quebra de polissacarídeos da parede, liberando oligossacarinas, que podem estar relacionadas com um sistema regulador gênico que conduz a transcrição de novos RNAm, responsáveis pela síntese de novas enzimas importantes na morfogênese.

A deficiência de cálcio reduz a estabilidade cromossômica, promovendo distúrbios na divisão celular e danifica as mitocôndrias (que são organelas ricas em cálcio), comprometendo o metabolismo respiratório. Os núcleos formados são pequenos e poliplóides, afetando a diferenciação de tecidos meristemáticos (Bergmann, 1992).

A textura dos calos está primariamente ligada a alteração na absorção mineral, bem como a alteração no estado hídrico e afrouxamento da parede celular. O baixo conteúdo de Ca^{2+} favorece a coesão entre as células de calos, afetando a textura, produzindo uma grande quantidade de calos compactos, quando comparado aos calos mantidos em um meio com alta concentração de Ca^{2+} (Montoro et al., 1995a). Em cravo a alta concentração de cálcio no meio inibe o crescimento de calos (Gabbrielli et al., 1995).

A concentração de cálcio é freqüentemente citada como um parâmetro que afeta a diferenciação celular, mas o seu efeito na embriogênese somática tem apenas sido recentemente relatado (Roberts & Haigler, 1990).

Em suspensões celulares de cenoura, Jansen et al. (1990) observaram que o aumento da concentração de cálcio no meio de cultura aumenta a freqüência de embriogênese somática em cenoura. Cho & Kasha (1995) verificaram que a adição de $CaCl_2$ ao meio de cultura aumenta a formação de embriões em cevada e trigo, indicando a ação do cálcio sobre a embriogênese.

A embriogênese somática via calos compactos é favorecida pelo baixo conteúdo de cálcio, o qual tem sido relatado como estimulador da absorção de nitrogênio (Montoro et al., 1995a). Por outro lado, Etienne et al. (1997) verificaram o

efeito positivo de altas concentrações de cálcio em meio de indução na proliferação de calos friáveis e indução de embriogênese somática em *Hevea brasiliensis*, concluindo que altas concentrações de CaCl_2 promovem a manutenção do estágio embriogênico em calos mantidos por longos períodos em cultura e favorecem o processo de indução de embriogênese, principalmente para espécies consideradas como recalcitrantes em relação à embriogênese somática.

2.5.4 Magnésio

O magnésio é transportado no xilema e redistribuído principalmente no floema, servindo portanto para balancear e neutralizar ânions inorgânicos e orgânicos. A absorção do magnésio é afetada pelo excesso de cátions como K^+ , NH_4^+ e Ca^{2+} , enquanto que a presença de NO_3^- favorece a absorção do Mg^{2+} (Mengel & Kirkby, 1987).

O magnésio é um componente importante nas reações metabólicas que envolvem transferência de fosfato e utilização de ATP, mesmo em calos e raízes que não são fotossintetizantes e, portanto, não sintetizam clorofila (Caldas et al., 1998).

De acordo com Dussert et al. (1995b), a indução de embriogênese somática em *Cocos nucifera* requer altas concentrações de NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . O requerimento por magnésio na indução de embriogênese somática está associado ao seu efeito na atividade de muitas enzimas.

O magnésio tem uma função essencial na agregação das subunidades ribossômicas, sendo necessário também para a RNA polimerase e para a formação de RNA no núcleo, implicando portanto na sua importância na síntese de proteínas (Mengel & Kirkby, 1987; Marschner, 1995). Nos processos de diferenciação celular, há evidências de síntese intensa de proteínas, principalmente das chamadas "Late embryogenesis abundant proteins" (LEA), que antecede a ocorrência de embriogênese somática (Reid et al., 1999). De acordo com Dussert et al. (1995b), o aumento da atividade de enzimas está relacionada com a ativação da síntese de proteínas. Com as múltiplas funções do cálcio e magnésio no sistema enzimático, é concebível que a

iniciação de embriogênese somática esteja associada com o requerimento específico destes dois cátions.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, em Piracicaba/SP.

Mudas de *Dianthus caryophyllus* L. cv. Delphi, adquiridas junto ao produtor do município de Itapeva/MG, foram plantadas e mantidas em casa-de-vegetação, com a finalidade de servirem como matrizes para o fornecimento de explantes para o processo de calogênese.

3.2 Plantio das mudas

Foram utilizados vasos plásticos com 1 litro de capacidade, tendo como substrato areia lavada de granulometria média. Em cada vaso foram plantadas duas mudas de cravo, com aproximadamente 15 cm de comprimento e 6 pares de folhas. Durante o período de pegamento e aclimação (15 dias) em casa-de-vegetação as mudas foram irrigadas somente com água.

3.3 Tratamentos

Após o período de pegamento e aclimação, as mudas foram tratadas com a solução nutritiva de Sarruge (1975) e com soluções nutritivas contendo 0X, $\frac{1}{4}$ X, $\frac{1}{2}$ X, 1X e 2X da concentração dos nutrientes nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio (Tabelas 1 e 2) presentes na solução completa.

Em cada experimento, sob delineamento experimental ao acaso, o nível do nutriente representou um tratamento, sendo que cada tratamento foi constituído por 20 vasos, contendo 2 mudas de cravo cada um, perfazendo um total de 100 vasos (5 tratamentos X 20 repetições).

As soluções nutritivas foram aplicadas de acordo com as necessidades das plantas (cada 3 dias).

3.4 Coleta de explantes

As plantas tiveram seus ápices contendo até 4 pares de folhas expandidas removidos para utilização como fonte de explantes. A retirada destes explantes (folha, segmento nó e entrenós) foi efetuada em três diferentes épocas durante a fase de crescimento vegetativo das plantas, sendo a primeira realizada aos 30 dias (Época 1), a segunda aos 45 dias (Época 2) e a terceira aos 60 dias (Época 3) após início da aplicação das soluções nutritivas.

3.5 Assepsia do material vegetal

Em todos os experimentos as plantas matrizes foram pulverizadas na região do colo com o fungicida sistêmico Benlate 500 (0,7 g L⁻¹) para o controle de fusariose (*Fusarium sp.*).

O material coletado foi imerso em solução de água destilada autoclavada e detergente neutro (TWEEN-20) a 0,1% (v/v) por 5 minutos. Sob condições assépticas na câmara de fluxo laminar, o material vegetal foi transferido para solução de hipoclorito de sódio comercial (Q-Boa) a 20% (v/v) e TWEEN-20 a 0,1% (v/v), mantido por 20 minutos em agitação e posteriormente lavado quatro vezes em água destilada autoclavada.

Tabela 1. Composição química das diferentes soluções nutritivas (mL L⁻¹) adaptada de Sarruge (1975), empregadas no tratamento de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L., em casa-de-vegetação.

Soluções estoque	Tratamentos															
	Nitrogênio				Potássio				Cálcio				Magnésio			
	0X	$\frac{1}{4}$ X	$\frac{1}{2}$ X	1X	2X	0X	$\frac{1}{4}$ X	$\frac{1}{2}$ X	1X	2X	0X	$\frac{1}{4}$ X	$\frac{1}{2}$ X	1X	2X	2X
KH ₂ PO ₄	1M	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1
KNO ₃	1M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	5	5	5	3
Ca(NO ₃) ₂	1M	-	-	-	-	-	5	5	5	5	-	-	-	-	-	4
MgSO ₄	1M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-
KCl	1M	5	5	5	5	5	-	2,5	5	10	20	-	-	-	-	2
CaCl ₂	1M	5	5	5	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
NH ₄ H ₂ PO ₄	1M	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1
NH ₄ NO ₃	1M	-	1,25	2,5	5	10	2	2	2	2	2	5	5	5	5	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	1M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
NaNO ₃	0,5M	-	2,5	5	10	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,5M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	5	10	20	-
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5
Micronutr.*	1	1	1	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	1	1	1

(M) - Concentração da solução estoque (Molar = 1 mol L⁻¹)

* Composição da solução de micronutrientes (g L⁻¹): H₃BO₃ 2,86; MnCl₂.4. H₂O 1,81; ZnCl₂ 0,10; CuCl₂ 0,04; H₂MoO₄.H₂O 0,02.

** Procedimento do preparo de 1 litro da solução de Fe-EDTA: dissolveu-se 26,1 g de EDTA dissódico em 286 mL de NaOH 1 N, e misturou-se com 24,0 g de FeSO₄.7H₂O. Arejou-se a solução por uma noite e completou o volume com água deionizada.

Tabela 2. Composição em nutrientes das soluções nutritivas utilizadas nos tratamentos para a nutrição de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L., em casa-de-vegetação.

Experimentos	Nutrientes	Concentrações (mg L ⁻¹)				
		0X	$\frac{1}{4}$ X	$\frac{1}{2}$ X	1X*	2X
1	Nitrogênio	0	52,5	105	210	420
2	Potássio	0	58,5	117	234	468
3	Cálcio	0	50	100	200	400
4	Magnésio	0	12	24	48	96

* A solução representada por 1X corresponde a solução nutritiva completa de Sarruge (1975).

3.6 Indução de calogênese

Com o auxílio de pinças e bisturis assépticos, foram retirados as bases das folhas e os segmentos nó e entrenós da região do segundo e terceiro par de folhas expandidas, os quais foram utilizados como explantes. Estes explantes foram pesados em balança de precisão e inoculados em meio de cultura contendo os sais básicos e vitaminas de Murashige & Skoog (1962) (Tabela 3), suplementado com 87,6 μ M de sacarose, 1,0 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, 2 μ M de cinetina e 3 μ M de 2,4-D (Frey et al., 1992), solidificado com 2,3 g L⁻¹ de Phytigel (Sigma), e pH a 5,8 ajustado com KOH 1 N, antes da autoclavagem a 120°C por 40 minutos. Os frascos utilizados foram vidros contendo 20 mL do meio de cultura e vedados com tampa plástica.

Os valores médios da massa de matéria fresca dos explantes, em gramas, foram: folha $0,019 \pm 0,004$, entrenós $0,058 \pm 0,06$ e nó $0,076 \pm 0,06$.

A incubação do material foi feita em sala de crescimento com intensidade luminosa de 2000 lux, sob condições de fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e temperatura de $26^\circ\text{C} \pm 2$.

Aos 30 dias após a inoculação foi realizada a transferência dos calos para um novo meio de cultura de mesma composição química utilizada no protocolo descrito anteriormente.

3.7 Avaliação da calogênese

Aos 60 dias após a inoculação foi efetuada a avaliação de massa de matéria fresca dos calos. Após a pesagem os calos foram acondicionados em sacos de papel e mantidos em estufa com circulação forçada de ar a 60°C até atingirem massa constante. Após a secagem do material, este foi pesado novamente em balança de precisão para a obtenção de massa de matéria seca.

Na análise dos dados usou-se a diferença entre a massa de matéria fresca total formada e a massa de matéria fresca inicial do explante para a obtenção do valor da massa de matéria fresca de calos, enquanto que para a massa de matéria seca a massa do explante foi desconsiderada devido às dificuldades em se conhecer a massa de matéria seca do explante remanescente naquele momento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com 20 repetições para cada explante de cada tratamento. Os dados em gramas de massa de matéria fresca e seca de calos foram transformados pela equação $\sqrt{x+1}$, e submetidos a análise de variância e regressão, conforme as metodologias descritas por Pimentel-Gomes (1990).

Tabela 3. Componentes nutricionais do meio básico de Murashige & Skoog (1962) empregados na indução de calogênese em explantes de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L.

Componentes	Concentração (mg L⁻¹)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650,000
KNO ₃	1900,000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000
KH ₂ PO ₄	170,000
Micronutrientes	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600
H ₃ BO ₃	6,200
KI	0,830
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,300
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,800
Ácido nicotínico	0,500
Tiamina	1,000
Piridoxina	0,500
Glicina	3,000
I-inositol	100,000

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo do período de tratamento com as diferentes soluções nutritivas (60 dias), os cravos não apresentaram sintomas visíveis de deficiência ou de excesso dos nutrientes nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio. De acordo com Winsor & Adams (1987), o cravo é tolerante quanto à nutrição mineral, portanto não sendo os sintomas, tanto de deficiência como de excesso mineral, evidentes quando comparados a outras culturas em casa-de-vegetação.

Estas condições são altamente satisfatórias aos objetivos do presente trabalho, pois é de interesse testar plantas com deficiências capazes de causar apenas imperfeições metabólicas antes que sintomas de deficiências e toxidez morfológicas sejam manifestadas.

4.1 Tratamento com nitrogênio (Experimento 1)

Os resultados obtidos para a avaliação do efeito da nutrição de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L. com nitrogênio na calogênese (produção de massa de matéria fresca e seca de calos), pelos três diferentes tipos de explantes e nas três diferentes épocas de coletas mostrados nas Figuras 1, 2 e 3, indicam baixa influência das concentrações de nitrogênio na produção de massa de matéria fresca de calos pelos três tipos de explantes (folha, entrenós e nó), a qual variou com a duração do tratamento (30, 45 e 60 dias). Não houve interação significativa ($p \leq 0,05$) entre os níveis de nitrogênio e os três diferentes tipos de explantes nas três diferentes épocas de coleta no que diz respeito ao ganho de massa de matéria seca dos calos.

4.1.1 Folha

Através dos dados da Figura 1 observa-se que níveis crescentes de nitrogênio apresentaram efeito significativo ($p \leq 0,05$) na produção de massa de matéria fresca de calos pelo explante folha somente na calogênese induzida em explantes coletados aos 30 dias após o início dos tratamento (Época 1). Conforme o modelo de equação de regressão quadrática ($Y = 1,2519 + 0,0008470X - 0,00000166X^2$; $R^2 = 0,4637$), que representa a produção de massa de matéria fresca de calos em função das concentrações de nitrogênio na solução nutritiva, o ponto de produção máxima de massa de matéria fresca de calos aos 30 dias de tratamento (Época 1) foi de 1,36 g/explante, produzido na dose estimada de 255,1 mg L⁻¹ de N. O aumento das doses de nitrogênio até concentração por volta de 255 mg L⁻¹ de N causou acréscimo na produção de calos pelo explante folha coletado aos 30 dias (Época 1) e decréscimo para concentração de nitrogênio acima deste valor. Esta dose estimada foi superior a dose encontrada por Frett & Dirr (1986), que estudando o efeito do nitrogênio e do cálcio em plantas de petúnia, obtiveram maior produção de massa de matéria fresca de calos em explantes folha provenientes de plantas tratadas com 100 mg L⁻¹ de N. Na literatura o trabalho com petúnia foi o único a realizar pesquisa relacionando o estado nutricional de plantas matrizes com o processo de calogênese. De acordo com Marschner (1995), o ponto de inversão na curva de resposta de produção pode ser causado por fatores como toxicidade de um nutriente, ou deficiência induzida por um outro nutriente devido a um desbalanço iônico entre os nutrientes, como por exemplo, a indução de deficiência de potássio, cálcio e magnésio pelo amônio. Conforme este mesmo autor, o aumento da concentração de um nutriente estimula o crescimento, porém pode induzir uma deficiência de um outro nutriente pelo efeito diluição, que deve ser considerado na interpretação dos conteúdos de nutrientes em termos de antagonismo durante a absorção.

Nenhum efeito foi observado entre os níveis de nitrogênio empregados e a calogênese ($p \leq 0,05$) nos tratamentos de mais longa duração (45 e 60 dias), sendo portanto a produção de massa de matéria fresca de calos similar para estes tratamentos com nitrogênio (Figura 1). Resultados semelhantes foram também obtidos

para o ganho de massa de matéria seca; no qual houve um aparente efeito negativo dos níveis de nitrogênio na calogênese.

O nitrogênio, por fazer parte das proteínas entre elas a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), que representa 20-30% das proteínas das folhas de plantas C_3 ; ele se torna um dos fatores de crescimento importante para as plantas. A relativa atividade *in vitro* da Rubisco tem sido utilizada para estudar a fixação autotrófica e não autotrófica de CO_2 em tecidos de plantas C_3 sob condições de fontes de carbono e taxa de CO_2 controladas (Hanson & Edelman, 1972). Nestas condições a assimilação do CO_2 ocorre nos cloroplastos através da ação da Rubisco, no entanto a atividade desta enzima está relacionada com a integridade dos cloroplastos, isto é, do aparato fotossintético (Masmoudi et al., 1999). Entretanto, em cultura de células e calos o tipo de imobilização molecular é reduzido, pois estas células por não apresentarem quantidades significantes de clorofila e crescerem em meio contendo fonte de carbono independem de fotossíntese para seu crescimento. Este fato está provavelmente associado ao baixo efeito do nitrogênio na intensidade de calogênese observado neste trabalho para o explante folha. Adicionalmente, a alta translocabilidade do nitrogênio e os resultados obtidos para entrenós e nó em que se observa maior efeito do nitrogênio sugerem que a calogênese é diretamente dependente de nitrogênio.

O nitrogênio é transportado no xilema e redistribuído no floema em processos relativamente rápidos. A redistribuição do nitrogênio pelo floema é de alta mobilidade, sendo portanto redistribuído das folhas e órgãos mais velhos para os mais novos (Malavolta et al., 1997). Isto está certamente relacionado a ausência de efeito do nitrogênio nas folhas para os tratamentos de longa duração em que pela translocabilidade do nitrogênio a concentração satisfatória de nitrogênio foi recomposta.

4.1.2 Entrenós e nó

Observa-se nos dados das Figuras 2 e 3 que a variação nos níveis de nitrogênio afetou a produção de massa de matéria fresca de calos pelos explantes entrenós e nó de maneira proporcional aos níveis de nitrogênio e a duração dos

tratamentos. Este efeito não foi significativo nos tratamentos de curta (30 dias) e média (45 dias) duração, enquanto que em tratamento mais longo (60 dias) houve interação positiva entre os níveis de nitrogênio e estes explantes ($p \leq 0,05$). Como as respostas de produção de calos pelos explantes entrenós e nó se ajustaram aos 60 dias de tratamento a um modelo de equação de regressão do tipo linear, as concentrações de nitrogênio que produziram máxima massa de matéria fresca de calos não ficaram aparentes, mas podem ser estimadas a partir das equações de regressão $Y = 1,5154 + 0,0002020X$ ($R^2 = 0,4693$) e $Y = 1,5506 + 0,0003806X$ ($R^2 = 0,8469$), respectivamente (Figuras 2 e 3). Estes resultados indicam exigência de níveis maiores de nitrogênio do que os utilizados neste trabalho para proporcionar produção máxima de calos. Isto é provavelmente devido à alta translocabilidade de nitrogênio para as folhas e regiões de crescimento, evidenciando portanto o efeito diretamente proporcional da concentração do nitrogênio na calogênese. A redistribuição do nitrogênio pelo floema é de alta mobilidade, sendo portanto redistribuído de tecidos e órgãos mais velhos para as folhas e regiões de crescimento (Malavolta et al., 1997). Este comportamento está relacionado com os dados obtidos para a duração dos tratamentos com nitrogênio, isto é, das épocas de coletas dos explantes entrenós e nó na produção de calos. Explantes procedentes de tecidos maduros estarão susceptíveis a serem afetados com mais intensidade pela nutrição deficiente de nitrogênio. Conforme Raven et al. (1992), as duas principais funções associadas ao caule, do qual entrenós e nó fazem parte, são condução e sustentação. Através do caule são transportados os nutrientes minerais, água e substâncias sintetizadas nas folhas, por intermédio do xilema e floema, para os locais de utilização, incluindo folhas, raízes e frutos, enquanto que a folha é considerada o principal órgão fotossintético e de biossíntese celular da planta.

Aparentemente, nas condições deste trabalho a duração do tratamento com nitrogênio é um fator importante a ser observado. Explantes retirados de plantas matrizes no início do tratamento (30 dias) podem ainda estar sob efeito dos níveis de nutrientes minerais aplicados durante a fase de produção de mudas de cravo, ao baixo desenvolvimento das raízes, podendo assim mascarar o verdadeiro efeito do tratamento com nitrogênio na produção de calos pelos explantes coletados nesta época. Também variável intensidade de estresse ocorreu nas plantas durante a aclimação que somado ao estresse nutricional devido à irrigação com somente água

durante 15 dias podem ter influenciado consideravelmente os resultados para 30 dias de tratamento. Quanto a influência da idade fenológica dos explantes, esta pode ser desconsiderada pois os explantes foram sempre coletados na mesma posição da planta (segundo e terceiro par de folhas expandidas a partir do ápice).

Dentro do fator explante, verifica-se que independentemente do tratamento com nitrogênio (concentração e duração do tratamento), a maior produção de massa de matéria fresca e seca de calos foi sempre obtida pelo explante nó, seguido pelos explantes entrenós e folha. Entretanto, este comportamento pode estar associado e ser proporcional a massa de matéria fresca inicial dos explantes utilizados na inoculação. Os valores médios da massa de matéria fresca dos explantes, em gramas, foram: folha $0,019 \pm 0,004$, entrenós $0,058 \pm 0,06$ e nó $0,076 \pm 0,06$.

O metabolismo do nitrogênio está envolvido nos processos fisiológicos e bioquímicos associados ao controle de crescimento, diferenciação e morfogênese. Durante o crescimento celular, a assimilação do nitrogênio contribui para o aumento de macromoléculas e componentes celulares, importantes para a regulação dos processos metabólicos de crescimento celular, implicando no aumento de tamanho e número de células (Durzan, 1985), estando portanto associados ao maior acúmulo de matéria fresca e seca de calos nos tratamentos com nitrogênio de mais longa duração.

O nitrogênio além de afetar a calogênese possui um importante papel na diferenciação celular. De todos os nutrientes minerais, o nitrogênio na forma oxidada ou reduzida, provavelmente é responsável pelo mais pronunciado efeito no crescimento e diferenciação celular (Ozias-Akins & Vasil, 1985). A indução do processo de embriogênese somática requer um intenso metabolismo do nitrogênio (Montoro et al., 1995a), verificando-se frequentemente um acúmulo de proteínas principalmente as chamadas "late embryogenesis abundant proteins" (LEA) (Reid et al., 1999). Se ou não este fenômeno contribuiu para a variação de ganho de matéria fresca e/ou seca dos calos neste trabalho, a resposta fica prejudicada, pois nenhum controle ou observações da ocorrência de diferenciação celular foi efetuada.

O balanço entre os íons nitrato e amônio tem mostrado ser importante na embriogênese em células de cenoura selvagem (Wetherell & Dougall, 1976). O nitrato é importante para a diferenciação e crescimento de calos, enquanto que altas concentrações de amônio aumentam a frequência de embriões somáticos (Cunha &

Fernandes-Ferreira, 1999). Conforme Dussert et al. (1995b), o requerimento preferencial por NH_4^+ pode ser atribuído ao aumento da síntese de proteína durante a iniciação da embriogênese somática. O nível e a fonte de nitrogênio também são responsáveis pelo controle da organogênese (Handro & Floh, 1990).

MASSA DE MATÉRIA FRESCA (MMF)

MASSA DE MATÉRIA SECA (MMS)

Figura 1 - Efeito dos tratamentos com nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio na calogênese (massa de matéria fresca e seca de calos em g/explante) em explante folha de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L., avaliado em três diferentes épocas de coleta. Cada resultado é média de vinte repetições para massa de matéria fresca de calos e dez repetições para massa de matéria seca de calos, e as curvas podem ser representadas pelas seguintes equações:

(A1) - Nitrogênio - massa de matéria fresca:

época 1 ($Y = 1,2519 + 0,0008470X - 0,00000166X^2$; $R^2 = 0,4637^*$)

época 2 ($Y = 1,3637 + 0,0000189X - 0,00000004X^2$; $R^2 = 0,0292^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,3422 + 0,0001379X - 0,00000004X^2$; $R^2 = 0,0175^{ns}$)

(A2) - Nitrogênio - massa de matéria seca:

época 1 ($Y = 1,0273 + 0,00005X - 0,00000001X^2$; $R^2 = 0,4735^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,0346 - 0,00002X + 0,00000003X^2$; $R^2 = 0,3292^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,0340 - 0,00002X + 0,00000003X^2$; $R^2 = 0,1846^{ns}$)

(B1) - Potássio - massa de matéria fresca:

época 1 ($Y = 1,1920 + 0,0007158X - 0,00000098X^2$; $R^2 = 0,7204^*$)

época 2 ($Y = 1,3011 - 0,000295X$; $R^2 = 0,6750^*$)

época 3 ($Y = 1,4197 - 0,0006537X + 0,00000136X^2$; $R^2 = 0,5833^*$)

(B2) - Potássio - massa de matéria seca:

época 1 ($Y = 1,0225 + 0,0000178X$; $R^2 = 0,8644^*$)

época 2 ($Y = 1,0291 - 0,0000104X$; $R^2 = 0,3122^*$)

época 3 ($Y = 1,0357 - 0,0000429X + 0,00000008X^2$; $R^2 = 0,6144^*$)

(C1) - Cálcio - massa de matéria fresca:

época 1 ($Y = 1,3154 - 0,000048X$; $R^2 = 0,0742^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,2544 + 0,0002005X$; $R^2 = 0,2891^*$)

época 3 ($Y = 1,3652 - 0,0013084X + 0,000003X^2$; $R^2 = 0,9301^*$)

(C2) - Cálcio - massa de matéria seca:

época 1 ($Y = 1,0244 - 0,0000479X + 0,00000011X^2$; $R^2 = 0,6272^*$)

época 2 ($Y = 1,0178 + 0,000044X - 0,00000008X^2$; $R^2 = 0,3448^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,0200 - 0,0000126X + 0,00000004X^2$; $R^2 = 0,2577^{ns}$)

(D1) - Magnésio - massa de matéria fresca:

época 1 ($Y = 1,2472 + 0,0005905X$; $R^2 = 0,7764^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,2182 + 0,0016384X - 0,00001723X^2$; $R^2 = 0,3793^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,3330 - 0,0008166X$; $R^2 = 0,3735^{ns}$)

(D2) - Magnésio - massa de matéria seca:

época 1 ($Y = 1,0216 + 0,0000934X - 0,00000062X^2$; $R^2 = 0,7085^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,0158 + 0,0002279X - 0,00000203X^2$; $R^2 = 0,3432^*$)

época 3 ($Y = 1,0215 - 0,0001960X + 0,00000161X^2$; $R^2 = 0,9729^{ns}$)

* significativo a 5% de probabilidade ($\sqrt{x + 1}$) pelo teste F.

^{ns} não significativo.

Figura 2 - Efeito dos tratamentos com nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio na calogênese (massa de matéria fresca e seca de calos em g/explante) em explante entrenós de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L., avaliado em três diferentes épocas de coleta. Cada resultado é média de vinte repetições para massa de matéria fresca de calos e dez repetições para massa de matéria seca de calos, e as curvas podem ser representadas pelas seguintes equações:

(A1) - Nitrogênio - massa de matéria fresca:

época 1 ($Y = 1,4659 - 0,0003105X + 0,00000072X^2$; $R^2 = 0,7581^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,4691 + 0,0000855X$; $R^2 = 0,9299^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,5154 + 0,0002020X$; $R^2 = 0,4693^*$)

(A2) - Nitrogênio - massa de matéria seca:

época 1 ($Y = 1,0341 - 0,00001X$; $R^2 = 0,9055^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,0327 + 0,00001X$; $R^2 = 0,4852^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,0330 + 0,00001X$; $R^2 = 0,5434^{ns}$)

(B1) - Potássio - massa de matéria fresca:

época 1 ($Y = 1,4574 + 0,0004809X - 0,00000108X^2$; $R^2 = 0,9850^*$)

época 2 ($Y = 1,4652 + 0,0000470X$; $R^2 = 0,2746^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,4625 + 0,0001766X$; $R^2 = 0,7860^*$)

(B2) - Potássio - massa de matéria seca:

época 1 ($Y = 1,0293 + 0,0000172X - 0,00000003X^2$; $R^2 = 0,1637^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,0309 - 0,0000077X + 0,00000002X^2$; $R^2 = 0,4416^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,0322 + 0,0000168X - 0,00000003X^2$; $R^2 = 0,2289^{ns}$)

(C1) - Cálcio - massa de matéria fresca:

época 1 ($Y = 1,4331 + 0,0005002X - 0,00000133X^2$; $R^2 = 0,5522^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,4975 - 0,0001183X$; $R^2 = 0,5503^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,4944 - 0,0003272X + 0,00000079X^2$; $R^2 = 0,7963^{ns}$)

(C2) - Cálcio - massa de matéria seca:

época 1 ($Y = 1,0288 - 0,0000753X + 0,00000017X^2$; $R^2 = 0,7549^*$)

época 2 ($Y = 1,0299 - 0,0000612X + 0,00000014X^2$; $R^2 = 0,8703^*$)

época 3 ($Y = 1,0182 - 0,0000194X + 0,00000007X^2$; $R^2 = 0,9014^{ns}$)

(D1) - Magnésio - massa de matéria fresca:

época 1 ($Y = 1,4587 - 0,0001346X - 0,00000198X^2$; $R^2 = 0,3345^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,4348 + 0,0005092X$; $R^2 = 0,5350^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,4873 + 0,001549X - 0,00001427X^2$; $R^2 = 0,1148^{ns}$)

(D2) - Magnésio - massa de matéria seca:

época 1 ($Y = 1,0265 - 0,0000952X + 0,00000079X^2$; $R^2 = 0,1623^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,0257 + 0,0000477X - 0,00000034X^2$; $R^2 = 0,3149^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,0199 - 0,0000933X + 0,000000101X^2$; $R^2 = 0,6608^{ns}$)

* significativo a 5% de probabilidade ($\sqrt{x + 1}$) pelo teste F.

^{ns} não significativo.

Figura 3 - Efeito dos tratamentos com nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio na calogênese (massa de matéria fresca e seca de calos em g/explante) em explante nó de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L., avaliado em três diferentes épocas de coleta. Cada resultado é média de vinte repetições para massa de matéria fresca de calos e dez repetições para massa de matéria seca de calos, e as curvas podem ser representadas pelas seguintes equações:

(A1) - Nitrogênio - massa de matéria fresca:

época 1 ($Y = 1,5123 + 0,0000793X$; $R^2 = 0,5630^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,5268 + 0,0002668X - 0,00000047X^2$; $R^2 = 0,5170^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,5506 + 0,0003806X$; $R^2 = 0,8469^*$)

(A2) - Nitrogênio - massa de matéria seca:

época 1 ($Y = 1,0335 + 0,00002X - 0,00000006X^2$; $R^2 = 0,2790^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,0342 + 0,00004X - 0,00000008X^2$; $R^2 = 0,7094^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,0358 + 0,00004X - 0,00000004X^2$; $R^2 = 0,9879^{ns}$)

(B1) - Potássio - massa de matéria fresca:

época 1 ($Y = 1,5042 + 0,0008181X - 0,00000163X^2$; $R^2 = 0,7827^*$)

época 2 ($Y = 1,5280 + 0,0001531X$; $R^2 = 0,4927^*$)

época 3 ($Y = 1,5427 + 0,0001204X$; $R^2 = 0,7422^*$)

(B2) - Potássio - massa de matéria seca:

época 1 ($Y = 1,0290 + 0,000046X - 0,00000009X^2$; $R^2 = 0,8553^*$)

época 2 ($Y = 1,0333 + 0,0000106X$; $R^2 = 0,6242^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,0358 - 0,0000278X + 0,00000007X^2$; $R^2 = 0,7079^{ns}$)

(C1) - Cálcio - massa de matéria fresca:

época 1 ($Y = 1,4786 + 0,0004281X - 0,00000107X^2$; $R^2 = 0,6129^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,5415 - 0,0001181X$; $R^2 = 0,3802^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,5287 - 0,000290X + 0,00000005X^2$; $R^2 = 0,8632^{ns}$)

(C2) - Cálcio - massa de matéria seca:

época 1 ($Y = 1,0252 + 0,0000584X - 0,00000014X^2$; $R^2 = 0,6707^*$)

época 2 ($Y = 1,0294 - 0,0000438X + 0,0000001X^2$; $R^2 = 0,2667^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,0209 - 0,000043X + 0,00000011X^2$; $R^2 = 0,7541^*$)

(D1) - Magnésio - massa de matéria fresca:

época 1 ($Y = 1,4809 + 0,0010944X - 0,00001340X^2$; $R^2 = 0,3519^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,4959 + 0,0003477X - 0,00000643X^2$; $R^2 = 0,3023^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,5575 + 0,0009786X - 0,00000813X^2$; $R^2 = 0,0602^{ns}$)

(D2) - Magnésio - massa de matéria seca:

época 1 ($Y = 1,0274 + 0,0000173X - 0,00000022X^2$; $R^2 = 0,0130^{ns}$)

época 2 ($Y = 1,032 + 0,0000349X - 0,00000063X^2$; $R^2 = 0,2050^{ns}$)

época 3 ($Y = 1,0208 - 0,000023X + 0,00000057X^2$; $R^2 = 0,2460^{ns}$)

* significativo a 5% de probabilidade ($\sqrt{X+1}$) pelo teste F.

^{ns} não significativo.

MASSA DE MATÉRIA FRESCA (MMF)

MASSA DE MATÉRIA SECA (MMS)

MASSA DE MATÉRIA FRESCA (MMF)

MASSA DE MATÉRIA SECA (MMS)

4.2 Tratamento com potássio (Experimento 2)

Os resultados obtidos para a avaliação do efeito da nutrição de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L. com potássio na calogênese (produção de massa de matéria fresca e seca de calos), pelos três diferentes tipos de explantes coletados em três diferentes épocas (Figuras 1, 2 e 3), mostram que o tratamento com potássio afetou a produção de massa de matéria fresca e seca dos calos produzidos pelos três tipos de explantes, principalmente os explantes folha e nó, sendo o efeito duração do tratamento mais pronunciado para o explante folha.

4.2.1 Folha

O efeito dos diferentes níveis de potássio na calogênese, expresso em massa de matéria fresca e seca de calos está apresentado na Figura 1. O tratamento com potássio apresentou efeito significativo ($p \leq 0,05$) na calogênese (produção de massa de matéria fresca e seca de calos) pelo explante folha, a qual foi inversamente proporcional a duração do tratamento nos tratamentos de 45 e 60 dias de duração e diretamente proporcional no tratamento de 30 dias.

A produção de massa de matéria fresca de calos em função dos níveis de potássio na solução nutritiva nos tratamentos de curta (30 dias) e longa (60 dias) duração respondeu de acordo com os modelos de equação de regressão quadrática $Y = 1,1920 + 0,0007158X - 0,00000098X^2$ ($R^2 = 0,7204$) e $Y = 1,4197 - 0,0006537X + 0,00000136X^2$ ($R^2 = 0,5833$), respectivamente. A produção máxima de massa de matéria fresca de calos de 1,32 g/explante para 30 dias de tratamento ocorreu na dose estimada de 365,2 mg L⁻¹ de K, para 60 dias de tratamento a produção mínima de 1,34 g/explante ocorreu na dose estimada de 240,3 mg L⁻¹ de K. O efeito para a produção de massa de matéria fresca de calos no tratamento de média duração (45 dias) apresentou como resposta um modelo de equação de regressão linear $Y = 1,3011 - 0,000295X$ ($R^2 = 0,6750$), não sendo portanto apenas possível estimar o ponto de produção mínima em função das concentrações de potássio.

Perfis similares de tendência foi observado para os resultados de ganho de massa de matéria fresca e seca. Para a produção de massa de matéria seca de calos

pelo explante folha (Figura 1) foi observada interação significativa ($p \leq 0,05$) entre o tratamento com potássio e o explante nas três épocas de coleta (30, 45 e 60 dias). As respostas foram conforme as equações de regressão linear $Y = 1,0225 + 0,0000178X$ ($R^2 = 0,8644$) e $Y = 1,0291 - 0,0000104X$ ($R^2 = 0,3122$), que representam a produção de massa de matéria seca de calos aos 30 e 45 dias de tratamento, respectivamente, não sendo atingidos portanto os pontos de produção máxima e mínima dentro do intervalo de concentrações de potássio utilizadas no experimento; e equação de regressão quadrática $Y = 1,0357 - 0,0000429X + 0,00000008X^2$ ($R^2 = 0,6144$), que representa a produção de massa de matéria seca de calos aos 60 dias, com produção mínima de 1,03 g de calos/explante, obtida na dose estimada de 268,1 mg L⁻¹ de K.

De acordo com Mengel & Kirkby (1987), a extrema mobilidade do potássio pela planta inteira em consequência da permeabilidade da membrana propicia o transporte do K⁺ em direção as folhas mais jovens e a redistribuição do potássio das partes mais maduras da planta para as mais jovens. Entretanto a influência da idade fenológica dos explantes deve ser desconsiderada afetar os resultados deste trabalho pois os explantes foram sempre coletados na mesma posição da planta (segundo e terceiro par de folhas expandidas a partir do ápice). Por outro lado não fica descartado o efeito diluição nutricional devido ao crescimento da planta.

Como a resposta para a produção de calos foi mais efetiva no tratamento de menor duração (30 dias), explantes retirados de plantas matrizes no início do tratamento (30 dias) podem ainda estar sob efeito dos nutrientes minerais aplicados durante a fase de produção de mudas de cravo. As raízes também não estavam efetivamente desenvolvidas, podendo assim mascarar o verdadeiro efeito do tratamento com potássio na produção de calos pelos explantes coletados nesta época.

O potássio é ativador de muitas enzimas envolvidas na fotossíntese. Seu papel na fixação de CO₂ pode ser demonstrado mais claramente em cloroplastos isolados. Aumento na concentração externa, para níveis semelhantes ao do citosol de células intactas, estimula a fixação de CO₂ mais de três vezes. O potássio também é ativador de enzimas envolvidas na regulação da oxidação de carboidratos, principalmente do grupo das quinases, como a 6-fosfofrutoquinase, promovendo portanto a síntese de ácidos orgânicos (Läuchli & Pflüger, 1978). O potássio está estreitamente relacionado com os processos de assimilação de CO₂ e de N (Flowers & Läuchli, 1983), e em

presença de nitrogênio e suficiente esqueleto carbônico promove a assimilação de amônia, favorecendo a síntese de aminoácidos e conseqüentemente proteínas, importantes para a regulação dos processos metabólicos de crescimento celular (Durzan, 1985), estando portanto o potássio associado ao acúmulo significativo de massa de matéria fresca e seca de calos no tratamento de curta duração.

Deficiência de potássio promove algumas alterações químicas nas células, incluindo o acúmulo de carboidratos solúveis, redução do conteúdo de amido e acúmulo de compostos nitrogenados solúveis (Marschner, 1995). A alteração do metabolismo do carboidrato está relacionada com o alto requerimento por potássio de certas enzimas regulatórias que catalisam a transferência do grupo fosfato, particularmente da piruvato quinase e fosfofrutoquinase, que regulam o fluxo de intermediários metabólicos da glicose a piruvato (Läuchli & Pflüger, 1978). Na deficiência de potássio o papel deste íon na síntese de proteína reflete no acúmulo de compostos nitrogenados solúveis, tais como amidas, aminoácidos, amônia, nitrato, além de certas aminas como putrescina, agmatina, N-carbamil-putrescina, decorrentes da maior absorção do nitrogênio, magnésio e cálcio (Malavolta & Crocomo, 1982; Marschner, 1995). Estes processos metabólicos estão envolvidos no controle de crescimento celular, afetando conseqüentemente a calogênese, aqui expressa em ganho de massa de matéria fresca e seca de calos.

4.2.2 Entrenós e nó

Os resultados para o tratamento com potássio na produção de massa de matéria fresca e seca de calos (Figuras 2 e 3) mostraram perfis similares para os explantes entrenós e nó ao longo do tratamento. Ficou aparente pelos resultados obtidos o ligeiro efeito dos níveis de potássio em promover a calogênese. No tratamento de curta duração (30 dias) os níveis crescentes de potássio apresentaram efeito significativo ($p \leq 0,05$) na produção de massa de matéria fresca de calos para ambos explantes. As respostas foram de acordo com as equações de regressão quadrática $Y = 1,4574 + 0,0004809X - 0,00000108X^2$ ($R^2 = 0,9850$) para entrenós e $Y = 1,5042 + 0,0008181X - 0,00000163X^2$ ($R^2 = 0,7827$) para nó. Os pontos de respectiva produção máxima de massa de matéria fresca de calos foram de 1,51 g de

calos/explante, produzido na dose estimada de 222,6 mg L⁻¹ de K, e de 1,61 g/explante, obtido a partir da dose estimada de 250,9 mg L⁻¹ de K. Para a produção de massa de matéria seca de calos pelo explante nó (Figura 3) no tratamento de curta duração (30 dias), verifica-se produção máxima de calos 1,04 g/explante na dose estimada de 255,5 mg L⁻¹ de K, de acordo com a equação de regressão quadrática $Y = 1,0290 + 0,000046X - 0,00000009X^2$ ($R^2 = 0,8553$).

Os níveis crescentes de potássio apresentaram efeito significativo ($p \leq 0,05$) na produção de massa de matéria fresca de calos (Figuras 2 e 3) pelo explante entrenós no tratamento de longa duração (60 dias) e pelo explante nó nos tratamentos de média e longa duração (45 e 60 dias). No tratamento de média duração (45 dias) o efeito para a produção de massa de matéria fresca de calos pelo explante nó apresentou como resposta a equação de regressão linear $Y = 1,5280 + 0,0001531X$ ($R^2 = 0,4927$), e no tratamento de longa duração (60 dias) a produção de calos pelos explantes entrenós e nó em função das concentrações de potássio na solução nutritiva foi representada pelas equações de regressão linear $Y = 1,4625 + 0,0001766X$ ($R^2 = 0,7860$) e $Y = 1,5427 + 0,0001204X$ ($R^2 = 0,7422$), respectivamente, não sendo portanto possível estimar a produção máxima com as concentrações de potássio utilizadas no experimento. Quanto a produção de massa de matéria seca de calos (Figuras 2 e 3) nenhum efeito foi observado entre os níveis de potássio empregados e a calogênese nos tratamentos de mais longa duração (45 e 60 dias).

No tratamento de curta duração (Figuras 2 e 3), acréscimos na concentração de potássio até por volta de 220-290 mg L⁻¹ proporcionaram aumento na produção de massa de matéria fresca de calos pelos explantes e redução para concentrações de potássio acima deste valor. Como o ponto de inversão na curva de resposta de produção pode estar associado a toxicidade de um nutriente, ou a uma deficiência induzida por um outro nutriente devido a um desbalanço iônico entre os nutrientes (Marschner, 1995), altas concentrações de potássio possivelmente podem ter interferido na absorção e disponibilidade fisiológica de cálcio e magnésio, resultando na redução de ganho de massa de matéria fresca de calos.

O potássio se caracteriza pela alta translocabilidade pela planta via xilema e floema. Ao contrário do cálcio, que tem funções estruturais mas mobilidade limitada, o

potássio atua como carregador iônico de alta mobilidade que forma apenas complexos iônicos fracos que são prontamente trocados (WYN Jones et al., 1979).

De acordo com Marschner (1995), o potássio, em associação com ânions orgânicos e inorgânicos, é o principal soluto necessário no vacúolo para a expansão celular. Além dos processos fisiológicos, o crescimento celular também está associado aos processos bioquímicos. A relação entre metabolismo celular, crescimento e a concentração de potássio é discutida por Leigh & WYN Jones (1984), através da hipótese de que quando a concentração de potássio no tecido vegetal é baixa, a concentração do potássio no vacúolo da célula pode ficar abaixo de seu nível crítico, causando redução de sua concentração no citosol, resultando na redução dos processos metabólicos dependentes de K^+ , e conseqüentemente reduzindo o crescimento celular. O potássio, como outros cátions no citosol, tem a função de neutralizar ânions orgânicos e inorgânicos, estabilizando o pH entre 7 e 8 neste compartimento, valores ótimos para as reações enzimáticas (Marschner, 1995). Isto pode estar relacionado ao fato de que explantes entrenós e nó extraídos de plantas tratadas com solução nutritiva contendo baixos teores de potássio produziram menos calos.

Estudos relacionando o estado nutricional em potássio de plantas matrizes tratadas com soluções nutritivas com o processo de calogênese não são encontrados na literatura, entretanto, existem trabalhos relacionando nutrição mineral associando composição mineral do meio de cultura no crescimento de células *in vitro*. Os resultados destas pesquisas não servem como referências à abordagem nutricional enfocada em nosso trabalho. A composição química do meio de cultura utilizado foi sempre constante. Entretanto, estes resultados estabelecem demandas nutricionais que ilustram nossos resultados, e, dentro de certos limites reforça-os. Ohira et al. (1973) observaram que elevados teores de N, K^+ e P no meio de cultura aumentaram substancialmente a taxa de crescimento em cultura de células em arroz. Ben-Hayyim et al. (1987), baseando-se na análise da concentração interna celular de nutrientes em cultura de células de *citrus*, sugeriram que a concentração interna de potássio se relaciona com crescimento de células em meio de cultura contendo várias concentrações de sais, como NaCl e $CaCl_2$, da mesma forma, Chée et al. (1992), relataram que altas concentrações de K^+ e NH_4NO_3 no meio de cultura, ingredientes

que juntamente com fonte de carbono adequada respondem pela síntese de proteínas, aumentaram a produção de calos embriogênicos em batata doce.

O crescimento e a diferenciação celular podem ser controlados por vários componentes do meio de cultura. Quando a diferenciação é o objetivo do estudo, a atenção é usualmente direcionada aos reguladores de crescimento, entretanto, a nutrição mineral também possui um importante papel neste processo (Ozias-Akins & Vasil, 1985). Reinert et al. (1967) mostram que o potássio é importante na embriogênese de *Daucus carota*. A concentração de potássio necessária para expressar o máximo potencial embriogênico é maior do que a requerida para o crescimento em cultura de suspensão de cenoura selvagem, e muito do efeito do nitrogênio na embriogênese parece depender da concentração de potássio (Brown et al., 1976).

4.3 Tratamento com cálcio (Experimento 3)

Os resultados obtidos para a avaliação do efeito da nutrição de *Dianthus caryophyllus* L. com cálcio na calogênese (produção de massa de matéria fresca e seca de calos), pelos três diferentes tipos de explantes e nas três diferentes épocas de coletas (Figuras 1, 2 e 3), indicam que o tratamento com cálcio afetou a calogênese pelos três tipos de explantes (folha, entrenós e nó), a qual variou com a duração do tratamento (30, 45 e 60 dias).

4.3.1 Folha

A produção de massa de matéria fresca de calos (Figura 1) em função dos diferentes níveis de cálcio foi similar para tratamentos por 30 e 45 dias, sendo linearmente dependente da concentração de cálcio. Estatisticamente houve diferenças ($p \leq 0,05$) entre o tratamento com cálcio e o explante folha nos tratamentos de média (45 dias) e longa duração (60 dias). No tratamento de média duração (45 dias) a produção de massa de matéria fresca de calos em função das concentrações de cálcio na solução nutritiva apresentou como resposta um modelo de equação de regressão linear $Y = 1,2544 + 0,0002005X$ ($R^2 = 0,2891$), no qual dentro do intervalo de concentrações de cálcio utilizadas no experimento não foi alcançado o ponto de produção máxima. Observa-se que a produção de calos foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações de cálcio. Entretanto, no tratamento de longa duração (60 dias) a calogênese foi representada pela equação de regressão quadrática $Y = 1,3652 - 0,0013084X + 0,000003X^2$ ($R^2 = 0,9301$), que representa a produção de massa de matéria fresca de calos em função dos níveis de cálcio na solução nutritiva, com produção mínima de 1,22 g de calos/explante, produzida a partir da dose estimada de 218,1 mg L⁻¹ de Ca. Este valor é menor do que aqueles obtidos por Frett & Dirr (1986), que estudando o efeito do N e Ca²⁺ em plantas de petúnia, obtiveram maior produção de massa de matéria fresca de calos em explantes folha provenientes de plantas tratadas com as doses 75 e 150 mg L⁻¹ de Ca, de acordo com um modelo de equação quadrática positiva.

A produção de massa de matéria seca de calos pelo explante folha, a exemplo do observado com matéria fresca (Figura 1), mostrou duas diferentes tendências: uma positivamente proporcional (45 dias de tratamento) e outra negativamente proporcional (30 e 60 dias de tratamento) à concentração de cálcio. Interação significativa ($p \leq 0,05$) somente ocorreu no tratamento de curta duração (30 dias), afetando negativamente a produção de massa de matéria seca de calos conforme demonstra a equação de regressão quadrática $Y = 1,0244 - 0,0000479X + 0,00000011X^2$ ($R^2 = 0,6272$), com produção mínima de 1,02 g/explante, obtida na dose estimada de $217,7 \text{ mg L}^{-1}$ de Ca.

Explantos extraídos de plantas tratadas com soluções nutritivas contendo cálcio por durante 45 dias apresentaram produção de calos diretamente proporcional ao aumento das concentrações de cálcio. De acordo com Marschner (1995), apesar do cálcio estar envolvido na divisão celular, a redução no crescimento na falta de cálcio exógeno é primariamente resultado da inibição da expansão celular. O cálcio é responsável pela rigidez da parede celular pela sua participação na constituição da lamela média. Por outro lado, para que ocorra expansão celular a perda de cálcio da parede é necessária, processo pelo qual envolve a acidificação do apoplasto induzida por auxina em presença de cálcio, resultando no afrouxamento da parede celular e conseqüentemente na expansão celular, podendo então implicar no maior acúmulo de massa de matéria fresca de calos.

No processo de expansão celular a auxina atua na secreção de H^+ através da membrana plasmática, promovendo acidificação e a remoção de pontes de cálcio da parede celular, resultando no aumento da plasticidade, possibilitando que potencial de pressão favoreça o crescimento celular. A auxina também ativa os canais de cálcio na membrana plasmática conduzindo a um aumento da concentração de cálcio citosólico (Cho & Hong, 1996), que atua na síntese da parede celular (Eklund & Eliasson, 1990), importante durante o processo de divisão celular.

De acordo com Bush (1995), o sistema Ca-calmodulina, que responde às alterações da concentração de cálcio citosólico, está implicado na regulação de muitos processos metabólicos, incluindo a divisão e o crescimento celular. Estes processos que estão relacionados com a indução de calos são controlados pela expressão de vários genes que determinam a formação de relevantes proteínas (Fujita et al., 1991), afetando a calogênese.

A calogênese torna-se limitante em presença de altos níveis de cálcio, resultante do efeito inibitório das altas concentrações de cálcio sobre as enzimas (Mengel & Kirkby, 1987), além de inibir a absorção de magnésio, que está relacionado com a síntese protéica e ativação de enzimas (Marschner, 1995), importantes na regulação dos processos de crescimento celular.

4.3.2 Entrenós e nó

Observa-se nos dados das Figuras 2 e 3 que o perfil das curvas de produção de massa de matéria fresca de calos pelos explantes entrenós e nó foi semelhante ao longo do tratamento com cálcio (30, 45 e 60 dias), e não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes concentrações de cálcio e duração dos tratamentos. Portanto, a discussão a seguir se restringe aos resultados da calogênese referentes a produção de massa de matéria seca de calos.

Os resultados para a produção de massa de matéria seca de calos pelos explantes entrenós e nó mostraram, a exceção do tratamento por 30 dias para explante nó, tendências polinomiais negativamente proporcionais a concentração de cálcio. Interação significativa ($p \leq 0,05$) entre o tratamento com cálcio para os explantes entrenós e nó (Figuras 2 e 3) foi observada no tratamento com cálcio por 30 dias. As respostas foram conforme a equação de regressão quadrática $Y = 1,0288 - 0,0000753X + 0,00000017X^2$ ($R^2 = 0,7549$) para o explante entrenós, que permite estimar o ponto de produção mínima de 1,02 g de calos/explante, obtido a partir da dose de 221,5 mg L⁻¹ de Ca, e equação de regressão quadrática $Y = 1,0252 + 0,0000584X - 0,00000014X^2$ ($R^2 = 0,6707$) para o explante nó, com produção máxima de calos de 1,03 g/explante, produzida a partir da dose estimada de 208,6 mg L⁻¹ de Ca. O perfil dos gráficos para produção de massa de matéria seca de calos foram similares para os explantes entrenós e nó aos 45 e 60 dias de tratamento (Figuras 2 e 3). O tratamento por 45 dias com cálcio afetou significativamente ($p \leq 0,05$) e de maneira inversamente proporcional a produção de calos pelo explante entrenós conforme a equação de regressão quadrática $Y = 1,0299 - 0,0000612X + 0,00000014X^2$ ($R^2 = 0,8703$), a qual permite estimar o ponto de produção mínima de 1,02 g de calos/explante, para a dose estimada de 218,6 mg L⁻¹ de Ca. No tratamento

de longa duração (60 dias) o cálcio afetou significativamente somente a produção de massa de matéria seca de calos pelo explante nó, e a resposta foi conforme a equação de regressão quadrática $Y = 1,0209 - 0,000043X + 0,00000011X^2$ ($R^2 = 0,7541$), que permite estimar a produção mínima de 1,02 g de calos/explante, obtida para a dose estimada de $195,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Ca.

A redução do crescimento e produção de massa de matéria seca de calos em função do aumento dos níveis de cálcio pode estar relacionada a vários fatores. O desbalanço iônico causado por altas concentrações de cálcio pode ter efeito inibitório competitivo na absorção dos cátions K^+ , NH_4^+ e Mg^{2+} (Mengel & Kirkby, 1987; Marschner, 1995), os quais têm função relacionada a síntese de proteínas e ativação de enzimas importantes na regulação dos processos metabólicos de crescimento celular (Durzan, 1985).

A redução da calogênese em função do aumento das concentrações de cálcio foi um comportamento similar aos resultados encontrados por Gabbrielli et al. (1995), que estudando em condições *in vitro* a toxicidade do níquel e o efeito do cálcio e magnésio em suspensão celular de *Dianthus caryophyllus* L., verificaram que alta quantidade de cálcio no meio de cultura inibiu o crescimento de calos. Estes resultados porém contradizem os resultados encontrados por Josekutty (1998), que trabalhando com *Impatiens flanaganiae*, observou rápida formação de calos induzida em altos níveis de cálcio no meio de cultura. Entretanto, Morard & Henry (1998) observaram que o aumento da concentração de sais reduz a calogênese, porém o cálcio é limitante em baixas concentrações, sendo necessária sua aplicação em elevadas concentrações no meio de cultura.

Além do desbalanço iônico, altas concentrações de cálcio podem afetar o crescimento, pois o cálcio é considerado mediador de muitas reações bioquímicas envolvidas nos processos metabólicos das plantas (Marschner, 1995). Muito do cálcio presente no tecido vegetal está localizado no apoplasto e vacúolos. A manutenção de baixa concentração de cálcio no citosol é de vital importância para a célula, uma vez que a presença de alta concentração de cálcio tem efeito citotóxico (McLaughlin & Wimmer, 1999) e pode inibir a atividade de enzimas localizadas no citosol, precipitar os fosfatos inorgânicos como o fosfato de cálcio e ainda competir com o magnésio pelos sítios de ligação (Mengel & Kirkby, 1987). A manutenção de baixa concentração

de cálcio no citosol é garantida pela ação de ATPases transportadoras de Ca^{2+} localizadas no plasmalema, as quais bombeiam o cálcio do citosol para o apoplasto e vacúolos (Malavolta et al., 1997).

A função do cálcio como mensageiro secundário é que certamente requer sua ocorrência em baixa concentração no citosol e em altas concentrações nos compartimentos adjacentes (apoplasto, mitocôndrias, retículo endoplasmático). Estímulos externos (luz, gravidade, mecânicos) e internos (hormônios) induzem a depolarização da membrana e ativam os canais de cálcio na membrana, aumentando o influxo de cálcio no citosol. O aumento na concentração do cálcio no citosol aumenta a ocorrência do complexo Ca^{2+} -calmodulina, que por sua vez, ativa numerosas enzimas envolvidas nos processos metabólicos (nucleotídeo fosfodiesterase, adenilato ciclase, NAD-quinase). O Ca^{2+} -calmodulina ativa também a Ca^{2+} -ATPase, que bombeia o cálcio de volta aos seus reservatórios, reduzindo o cálcio no citosol (Mengel & Kirkby, 1987; Marschner, 1995; Malavolta et al., 1997).

A duração do tratamento com cálcio parece ter papel importante na calogênese. Tratamento de mais longa duração (60 dias) apresentou efeito negativo na calogênese o que é compatível com o efeito negativo de altos teores de cálcio na calogênese. O cálcio apresenta baixa mobilidade fisiológica, a qual é refletida na baixa taxa de acúmulo, transporte de célula a célula e transporte via floema (Clarkson & Hanson, 1980). Em contraste aos outros macronutrientes, uma alta proporção do cálcio total no tecido vegetal está localizado na parede celular, resultado da abundância de sítios de ligação para o cálcio na parede celular e pelo transporte restrito do cálcio no citoplasma (Marschner, 1995). Conforme Mengel & Kirkby (1987), as plantas não são capazes de redistribuir o cálcio das folhas maduras para os tecidos de maior atividade meristemática e metabólica. Neste experimento os explantes foram sempre coletados da mesma posição da planta (segundo e terceiro par de folhas expandidas a partir do ápice), isto é, de folhas jovens, o que certamente pode ter afetado negativamente a calogênese, a qual foi inversamente proporcional a duração do tratamento.

O crescimento vegetal depende do cálcio e os processos de divisão e alongamento celular são afetados por este íon, de modo que a deficiência de cálcio inibe o crescimento e promove desordens fisiológicas, uma vez que a concentração de

cálcio citosólico livre regula diversos eventos intracelulares, como crescimento, desenvolvimento, metabolismo e outras funções mediadas por fitorreguladores (Hepler & Wayne, 1985).

O cálcio afeta a diferenciação celular, particularmente a embriogênese somática (Jansen et al., 1990). O cálcio é um agente indutor da morfogênese em plantas. Em *Eucalyptus urophylla* o cálcio afeta positivamente os teores de proteínas e açúcares totais, induzindo a produção de embriões somáticos a partir do desenvolvimento de centros meristemáticos compostos por células com elevada atividade mitótica e nucléolo evidente devido à alta síntese de proteínas (Arruda, 2000).

4.4 Tratamento com magnésio (Experimento 4)

Os resultados obtidos para a avaliação do efeito da nutrição de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L. com magnésio na calogênese (produção de massa de matéria fresca e seca de calos), pelos três diferentes tipos de explantes coletados em três diferentes épocas (Figuras 1, 2 e 3), indicam influência do magnésio na calogênese, a qual foi função da duração do tratamento.

A calogênese avaliada em produção de massa de matéria fresca de calos, com exceção do tratamento por 60 dias, mostrou tendência de ser ligeiramente dependente da concentração de magnésio para todos os explantes, sem apresentar entretanto nenhuma diferença significativa entre as concentrações e duração dos tratamentos. Portanto, a discussão a seguir se restringe ao ganho de massa de matéria seca de calos.

4.4.1 Folha

O efeito da calogênese avaliada em produção de massa de matéria seca de calos está apresentado na Figura 1. Tratamento com magnésio afetou significativamente ($p \leq 0,05$) somente a calogênese no tratamento de média duração (45 dias). Máxima produção estimada de 1,02 g de calos/explante folha foi obtida com concentração de magnésio de 56,1 mg L⁻¹, conforme a equação de regressão quadrática $Y = 1,0158 + 0,0002279X - 0,00000203X^2$ ($R^2 = 0,3432$).

Com o aumento das doses de magnésio até concentração por volta de 56 mg L⁻¹, houve acréscimo na produção de calos pelo explante coletado aos 45 dias e decréscimo para concentrações de magnésio acima deste valor. Resultados similares foram obtidos por He et al. (1989), porém em tratamentos com variação de magnésio no meio de cultura. Trabalhando com calos embriogênicos de trigo, estes autores observaram menor calogênese em concentrações mais baixas de magnésio no meio de cultura, indicando maior exigência de magnésio para proporcionar produção elevada de calos. O magnésio apresenta mobilidade limitada pelo floema sendo portanto redistribuído para as folhas mais jovens e regiões de crescimento. Ao contrário do cálcio, o magnésio é transportado no xilema e redistribuído principalmente

no floema, servindo portanto para balancear e neutralizar ânions inorgânicos e orgânicos, certamente criando desbalanço iônico e de pH nas regiões da planta com baixo nível de magnésio (Mengel & Kirkby, 1987). De acordo com Raven et al. (1992), o caule é o órgão responsável pela condução de água, sais minerais e substâncias sintetizadas nas folhas, por intermédio do xilema e floema, para os locais de utilização, tais como folhas, caule, raízes e frutos, enquanto que a folha é o principal órgão fotossintético e biossintético da planta, a qual requer regulação sistemática de pH.

Toxicidade de um nutriente ou deficiência induzida por um outro nutriente devido a um desbalanço iônico entre os nutrientes, como por exemplo, indução de deficiência de potássio e cálcio provocada pelo magnésio, podem ser responsáveis pelo ponto de inversão na curva de resposta de produção. Sabe-se que estes cátions têm função na regulação de processos metabólicos, incluindo a divisão e o crescimento celular. Estes processos que estão relacionados com a indução de calos são controlados pela expressão de vários genes que determinam a formação de proteínas (Fujita et al., 1991), afetando a calogênese.

O papel do magnésio é essencial nas reações bioquímicas ao nível celular. O Mg^{2+} é cofator de enzimas que atuam sobre substratos fosforilados (Mengel & Kirkby, 1987), sendo de grande importância no metabolismo energético (Epstein, 1972) durante o crescimento celular. Uma proporção substancial do magnésio está envolvido na regulação do pH celular e o magnésio vacuolar também é importante para o balanço cátion-ânion e regulação do turgor nas células (Marschner, 1995).

Estudo do efeito do cálcio na indução de embriogênese somática tem sido recentemente o objetivo de muitos estudos. Porém, para o magnésio o único trabalho que evidencia a importância deste íon na iniciação de embriogênese somática foi realizado por Dussert et al. (1995b). Nos processos de diferenciação celular, há evidências de síntese intensa de proteínas, principalmente das chamadas "late embryogenesis abundant proteins" (LEA), que antecede a ocorrência de embriogênese somática (Reid et al., 1999). O aumento da atividade de enzimas está relacionada com a ativação da síntese de proteínas. Com as múltiplas funções do cálcio e magnésio no sistema enzimático, é concebível que a iniciação de embriogênese somática esteja associada com o requerimento específico destes dois cátions (Dussert et al., 1995b).

4.4.2 Entrenós e nó

Observa-se nas Figuras 2 e 3 que os níveis crescentes de magnésio não apresentaram efeito significativo na calogênese (produção de massa de matéria seca de calos) pelos explantes entrenós e nó quando avaliados nas três épocas de coleta (30, 45 e 60 dias), sendo portanto a calogênese similar para as concentrações de magnésio e duração do tratamento.

Ausência de diferenças significativas para a calogênese avaliada em produção de massa de matéria fresca e seca de calos pode estar associada a alta mobilidade dos íons de magnésio pelo floema de tecidos e órgãos mais velhos para os mais novos e pela própria função do caule em conduzir água, sais minerais e substâncias sintetizadas pelas folhas, constituindo-se portanto principalmente de células condutoras sendo menos ativas biossinteticamente, ao contrário da folha, que é o principal órgão fotossintético e biossintético da planta.

A produção de massa de matéria seca de calos obtidos a partir de explantes extraídos de plantas matrizes tratadas em solução nutritiva não apresentou diferenças significativas entre as concentrações e duração do tratamento com magnésio, mesmo fornecendo ao meio de cultura nutrientes minerais favoráveis a calogênese. A concentração ótima de muitos nutrientes, incluindo NO_3^- , PO_4^{3-} , e K^+ , em plantas cultivadas *in vivo* é muito mais baixa do que as concentrações encontradas em meio de cultura de tecidos, sugerindo que a concentração de nutrientes utilizada em propagação *in vitro* é muito alta para o crescimento ideal das plantas. Entretanto, experimentos têm demonstrado que *in vitro* o meio de cultura pode ser rapidamente exaurido de nutrientes, incluindo NO_3^- , PO_4^{3-} , K^+ e Mg^{2+} , enquanto que outros nutrientes como o Ca^{2+} são absorvidos de forma mais lenta (Lumsdem et al., 1990).

5 CONCLUSÕES

O estado nutricional de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L. afetou a calogênese *in vitro*, a qual é dependente do explante.

O tratamento de matrizes de *Dianthus caryophyllus* L. com potássio e nitrogênio afetou a calogênese em explantes retirados da região nodal (especificamente o segmento nó) de maneira proporcional a concentração e duração dos tratamentos.

Teores de cálcio e magnésio inferiores e superiores a aqueles da solução nutritiva completa favoreceram a calogênese em explantes entrenós e nó, a qual foi também inversamente proporcional a duração do tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTVORST, A.C. van; YANCHEVA, S.; DONS, H. Cell within the nodal region of carnation shoots exhibit a high potential for adventitious shoot formation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.40, n.2, p.151-157, Feb. 1995.
- ALTVORST, A.C. van; KOEHORST, H.J.J.; BRUINSMA, T.; JANSEN, J.; CUSTERS, J.B.M.; JONG, J.; DONS, J.J.M. Adventitious shoot formation from *in vitro* leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) **Scientia Horticulturae**, v.51, n.3/4, p.223-235, Sept. 1992.
- AMÉZQUITA, M.O.; GRANADA, E.G.; ARBELÁEZ, G. Efecto de diferentes niveles de nitrogenio, potasio y pH en el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, agente causal del marchitamiento vascular del clavel. **Agronomía Colombiana**, v.10, n.1, p.90-102, ene. 1993.
- 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.
- BEM-HAYYIM, G.; KAFKAFI, U.; GANMORE-NEUMANN, R. Role of internal potassium in maintaining growth of cultured *Citrus* cells on increasing NaCl and CaCl₂ concentrations. **Plant Physiology**, v.85, n.2, p.434-439, Oct. 1987.
- BERGMAN, W. **Nutritional disorders of plants**: development, visual and analytical diagnosis. Jena: Gustav Fischer, 1992. 741p.

- BERINGER, H.; NOTHDURFT, F. Effects of potassium on plant and cellular structures. In: MUNSON, R.D. (Ed.) **Potassium in agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, 1985. cap.14, p.351-367.
- BESFORD, R.T. Use of pyruvate quinase activity of leaf extracts for quantitative assessment of potassium and magnesium status of tomato plants. **Annals of Botany**, v.42, p. 317-324, 1978.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture**: theory and practice, a revised edition. Amsterdam: Elsevier, 1996. 767p.
- BOULD, C.; HEWITT, E.J.; NEEDHAM, P. **Diagnosis of mineral disorders in plants**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1983. 174p.
- BROWN, D.C. W.; THORPE, T.A. Plant regeneration by organogenesis. In: VASIL, I. K. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants**: plant regeneration and genetic variability. New York: Academic Press, 1986. v.3, p.49-65.
- BROWN, S.; WETHERELL, D.F.; DOUGALL, D.K. The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. **Physiologia Plantarum**, v.37, p.73-79, 1976.
- BURBANO, L.E.; ERAZO, A.; AMÉZQUITA, M.O.; GRANADA, E.G. Efecto de la fertilization nitrogenada en la incidencia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* y *Heterodera trifoli* G. en clavel. **Agronomía Colombiana**, v.7, n.1/2, p.61-69, jan. 1990.
- 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.

- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, CNPH, 1998. v.1, p.87-132.
- CASTRO, P.R.C. Mecanismo de ação auxínica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, v.36, p.621-634, 1979.
- CASTRO, P.R.C. Reguladores vegetais: modo de ação e aplicações na agricultura tropical. **Informações Agronômicas**, n.78, p.5-7, jun. 1997.
- CHÉE, R.P.; LESKOVAR, D.I., CANTLIFFE, D.J. Optimizing embryogenic callus and embryo growth of a synthetic seed system for sweetpotato by varying media nutrient concentrations. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.117, n.4, p.663-667, July 1992.
- CHO, H.T.; HONG, Y.N. Effect of calcium channel blockers on the IAA-induced cell elongation of sunflower hypocotyl segments. **Journal of Plant Physiology**, v.149, n.3/4, p.377-383, Aug. 1996.
- CHO, U.H.; KASHA, K.J. The effect of calcium on ethylene production and microspore-derived embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. **Journal of Plant Physiology**, v.146, n.5/6, p.677-680, Sept. 1995.
- CHOUDHARY, M.L.; CHEE, K.C. Somatic embryogenesis in cell suspension culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **Plant Growth Regulation**, v.16, p.1-4, 1995.
- CLARKSON, D.T.; HANSON, J.B. The mineral nutrition of higher plants **Annual Review of Plant Physiology**, v.31, p.239-298, 1980.

- COLLIN, H.A.; WATTS, M. Flavor production in culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.) **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.729-747.
- CROCOMO, O.J. Biotecnologia de plantas: aplicações da engenharia celular. **Biotecnologia: agropecuária, energia e saúde**, n.17, jul. 1988.
- CROUCH, N.R.; STADEN, J. van. *In vitro* culture of *Dianthus zeyheri* subsp. *Natalensis*, a south african carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.35, n.1, p.81-85, Oct. 1993.
- CUNHA, A.; FERNANDES-FERREIRA, M. Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.): effect of carbon source, total inorganic nitrogen and balance between ionic forms and interaction between calcium and zeatin. **Journal of Plant Physiology**, v.155, n.4/5, p.591-597, Oct. 1999.
- CUZZUOL, G.R.F. Parâmetros bioquímicos e fisiológicos da vitrificação e do desenvolvimento do cravo (*Dianthus caryophyllus*) *in vitro*. Piracicaba, 1993. 89p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DAGUIN, F.; LETOUZÉ, R. Vitreous plants in vitrification in cultured tissues. **Physiologia Plantarum**, v.66, p.94-98, 1987.
- DEBERGH, P.C.A. Recent trends in the application of tissue culture to ornamentals. In: GREEN, G.E.; SOMERS, D.A.; HACKETT, W.P.; BIESBOER, D.D. **Plant tissue and cell culture**. New York: Alan R. Liss, 1987. v.3, p.383-394.

- DEBERGH, P.C.A.; ROGGEMANS, J.; STANAERT-DE-METSENAERE, R. Tissue culture in relation to ornamental plants. In: BHOJWANI, S.S. (Ed.) **Plant tissue culture: applications and limitations**. Amsterdam: Elsevier, 1990. cap.7, p. 161-189.
- DEMMINK, J.F.; CUSTERS, J.B.M.; BERGERVOET, J.H.W. Gynogenesis to bypass crossing barriers between diploid and tetraploid *Dianthus* species. **Acta Horticulturae**, n.216, p.343-344, Dec. 1987.
- DIXON, R.A. **Plant cell culture, a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. 236p.
- DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture**. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. 232p.
- DUSSERT, S.; VERDEIL, J.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. **Plant Science**, v.111, n.2, p.229-236, Nov. 1995b.
- DUSSERT, S.; VERDEIL, J.; RIVAL, A.; NOIROT, M.; BUFFARD-MOREL, J. Nutrient uptake and growth of *in vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) calluses. **Plant Science**, v.106, n.2, p.185-193, Apr. 1995a.
- DURZAN, D.J. Nitrogen metabolism and vegetative propagation of forest trees. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.) **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. cap.10, p.256-324.
- EKLUND, L.; ELIASSON, L. Effects of calcium ion concentration on cell wall synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v.41, n.228, p.863-867, July 1990.

ENGVILD, K.C. Callus and cell suspension cultures of carnation. **Physiologia Plantarum**, v.26, p.62-66, 1972.

EPSTEIN, E. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. New York: John Wiley, 1972. 412p.

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, J.H.; SORGER, G.J. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. **Annual Review of Plant Physiology**, v.17, p.47-76, 1966.

FEIRER, R.P.; MIGNON, G.; LITUAY, J.D. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. **Science**, v.223, n.4643, p.1433-1435. 1984.

FERNANDES, P.D.; WATANAKE, S.; OLIVEIRA, G.D.; HAAG, H.P. Nutrição mineral das plantas ornamentais. II. Absorção de macronutrientes pelo craveiro. In: HAAG, H.P.; MINAMI, K.; LIMA, A.M.L.P. (Ed.) **Nutrição mineral de algumas espécies ornamentais**. Campinas: Fundação Cargill, 1989. cap.3, p.22-31.

FLOWERS, T.L.; LÄUCHLI, A. Sodium versus potassium: substitution and compartmentation. In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R.L. (Ed.) **Inorganic plant nutrition**. Berlin: Springer Verlag, 1983. cap.5.3, p.651-681. (Encyclopedia of Plant Physiology, 15B).

- FRANCO, A. O comércio que floresce. **Panorama Rural**, n.11, p.21-25, jan. 2000.
- FRETT, J.J.; DIRR, M.A. Effect of nitrogen and calcium stock plant nutrition on *Petunia X Hybrida* leaf and anther explant growth *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.28, n.3, p.289-298, Apr. 1986.
- FREY, L.; JANICK, J. Organogenesis in carnation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.116, n.6, p.1108-1112, Nov. 1991.
- FREY, L.; SARANGA, Y.; JANICK, J. Somatic embryogenesis in carnation. **HortScience**, v.27, n.1, p.63-65, Jan. 1992.
- FUJITA, T.; ICHIKAWA, T.; SYONO, K. Changes in morphology, levels of endogenous IAA and protein composition in relation to the development of tobacco genetic tumor induced in the dark. **Plant Cell Physiology**, v.32, n.2, p.169-177, Mar. 1991.
- GABBRIELLI, R.; GORI, P.; SCALA, A. Ni toxicity on carnation (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Corrida) cell cultures: selection of Ni tolerant lines and effects of Ca and Mg. **Plant Science**, v.104, p.225-230, 1995.
- GALLO, L.A.; CROCOMO, O.J. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.25, p.494-506.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Edengton: Exegetics, 1984. 709p.
- GROUT, B.W.W. Meristem-tip culture. In Pollard, J.W.; WALKER, J.M. (Ed.) **Plant cell and tissue culture**. New Jersey: Human Press, 1990. cap.9, p.81-91.

GUERN, J. Regulation from within: the hormone dilemma. **Annals of Botany**, v.60, n.4, p.75-102, 1987.

HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus culture. **Phytomorphology**, v.28, n.1, p.74-81, Mar. 1978.

HACKETT, W.P.; ANDERSON, J.M. Aseptic multiplication and maintenance of differentiated carnation shoot tissue derived from shoot apices. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.90, p.365-369, June 1967.

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

HANSON, A.D.; EDELMAR, J. Photosynthesis by carrot tissue cultures. **Planta**, v.102, p.11-25, 1972.

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.

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

HOLLINGS, M.; STONE, O.M. Investigation of carnation viruses. II. Carnation mottle. **Annals of Applied Biology**, v.56, p.73-86, 1965.

HOOGENDOORN, Ch.; SPARNAAJ, L.D. International developments in production and consumption of carnation. **Acta Horticulturae**. Carnation Culture, n.216, p.159-165, Dec. 1987.

HOPKINS, W.G. **Introduction to plant physiology**. New York: John, 1995. 464p.

HUTCHINSON, F.F.; KAUL, V.; MAHESWARAN, G.; MORAN, J.R.; GRAHAM, M.W.; RICHARDS, D. Genetic improvement of floricultural crops using biotechnology. **Australian Journal of Botany**, v.40, n.6, p.765-768, Nov. 1992.

JANSEN, M.A.K.; BOOIJ, H.; SCHEL, J.H.N.; De VRIES, S.C. Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v.9, n.4, p.221-223, Aug. 1990.

JOSEKUTTY, P.C. Calcium mediated callus induction in *Impatiens flanaganiae*. **Phyton**, v.62, n.1/2, p.199-203, Jun. 1998.

KALLAK, H.; REIDLA, M.; HILPUS, I.; VIRUMÄE, K. Effects of genotype, explant source and growth regulations on organogenesis in carnation callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Cultures**, v.51, p.127-135, 1997.

KAUR-SAWHNEY, R.; SHIH, L.M.; GALSTON, A.W. Relation of polyamine biosynthesis to the initiation of sprouting in potato tubers. **Plant Physiology**, v.69, n.1/3, p.411-415, 1982.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.1, n.1, p.30-33, maio 1997.

LÄUCHLI, A.; PFLÜGER, R. Potassium transport through plant cell membranes and metabolic role of potassium in plants. In: INTERNATIONAL POTASH INSTITUTE CONGRESS, 11., Bern, 1978. **Potassium research: review and trends**, proceedings. Bern: Der Bund, 1979. p.111-163.

LAVON, R. Effect of potassium, magnesium, and calcium deficiencies on carbohydrate pools and metabolism in *Citrus* leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.120, n.1, p.54-58, Jan. 1995.

- LEIFERT, C.; MURPHY, K.M.; SUMSDEN, P.J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.14, n.2, p.83-109, Mar. 1995.
- LEIGH, R.A.; WYN JONES, R.G. A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and function of this ion in the plant cell. **New Phytologist**, v.97, p.1-3, 1984.
- LESHEM, B. Growth of carnation meristem in vitro: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in medium on their formation. **Annals of Botany**, v.52, p.413-415, 1983.
- LESHEM, B. Somaclonal variation in carnations. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: somaclonal variation in crop improvement I**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. v.11, cap.4, p.573-585.
- LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v.62, n.3, p.271-276, Sept. 1988.
- LISA, V. Cut flower crops (vegetatively propagated). In: LOEBENSTEIN, G.; LAWSON, R.H.; BRUNT, A.A. (Ed.) **Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops**. Chichester: Wiley, 1995. cap.34, p.385-395.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 2.ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1999. 1108p.
- LUMSDEN, P.J.; PRYCE, S.; LEIFERT, C. Effect of mineral nutrition on the growth and multiplication of *in vitro* cultured plants. In: NIJKAMP, H.J.J.; VAN DER PLAS, L.H.W.; VAN AARTRIJK, J. (Ed.) **Current plant science and biotechnology in agriculture: progress in plant cellular and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1990. p.108-113.

- MALAVOLTA, E.; CROCOMO, O.J. O potássio e a planta. In: YAMADA, T.; IGUE, K.; MIZILLI, O., USHERWOOD, N.R. (Ed.) **Potássio na agricultura brasileira**. Piracicaba: Instituto da Potassa & Fosfato, 1982. p. 95-162.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.
- MARMÉ, D. Calcium transport and function. In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R.L. (Ed). **Inorganic plant nutrition**. Berlin: Springer-Verlag, 1983. cap.5.1, p.599-625. (Encyclopedia of Plant Physiology, 15B).
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London: Academic Press, 1995. 889p.
- MASMOUDI, R.; RIVAL, A.; NATO, A.; LAVERGNE, D.; DRIRA, N.; DUCREUX, G. Carbon metabolism in *in vitro* cultures of date palm: the role of carboxylases (PEPC and RubisCO). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.57, n.2, p.139-143, 1999.
- MATSUNAGA, M. A indústria da flor no mundo e o comércio internacional do Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.3, n.2, p.1-4, 1997.
- MCLAUGHLIN, S.B.; WIMMER, R. Transley review n.104 - Calcium physiology and terrestrial ecosystem process. **New Phytologist**, v.142, p.373-417, 1999.
- MEDINA, T.L.A. Study of the effect of some mineral deficiencies on greenhouse carnations (*Dianthus caryophyllus*) in hidroponic culture. **Acta Horticulturae**, n.307, p.203-212, Aug. 1992.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. 4.ed. Bern: International Potash Institute, 1987. 655p.

- MESSEGUER, J.; ARCONADA, M.C.; MELE, E. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **Scientia Horticulturae**, v.54, n.2, p.153-163, May 1993.
- MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICCHIO, G. *Actinia deliciosa* C.F. Liang *in vitro*. I. Growth and mineral uptake by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.25, n.2, p.91-98, May 1991.
- MIL, M.; BUIATTI, M.; GIMELLI, F. Carnation. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Handbook of plant cell culture: ornamental species**. New York: McGraw-Hill, 1983. v.5, cap.12, p.284-317.
- MILLER, R.M.; KAUL, V.; HUTCHINSON, J.F.; RICHARDS, D. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus*) from axillary bud explants. **Annals of Botany**, v.67, n.1, p.35-42, Jan. 1991a.
- MILLER, R.M.; KAUL, V.; HUTCHINSON, J.F.; MAHESWARAN, G.; RICHARDS, D. Shoot regeneration from fragmented flower buds of carnation (*Dianthus caryophyllus*). **Annals of Botany**, v.68, n.6, p.563-568, Dec. 1991b.
- MONTORO, P.; ETIENNE, H.; CARRON, M.P. Effect of calcium on callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* Mill. Arg.: relations with callus mineral nutrition, nitrogen metabolism and water parameters. **Journal of Experimental Botany**, v.46, n.283, p.255-261, Feb. 1995a.
- MONTORO, P.; ETIENNE, H.; CARRON, M.P. Relation between nitrogen uptake, amino acid contents, and embryogenic intensity of rubber tree calli. **Journal of Plant Nutrition**, v.18, n.8, p.1693-1704, 1995b.
- MOORBY, J.; BESFORD, R.T. Mineral nutrition and growth. In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R.L. (Ed.) **Inorganic plant nutrition**. Berlin: Springer-Verlag, 1983. cap.5.1, p.481-527. (Encyclopedia of Plant Physiology, 15B).

- 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.
- MURALITHARAN, M.S.; CHANDLER, S.F.; VAN STEVENINCK, F.M. Effects of Na_2SO_4 , K_2SO_4 e KCl on growth and ion uptake of callus cultures of *Vaccinium corymborum* L. cv. Blue crop. **Annals of Botany**, v.69, n.5, p.459-465, May 1992.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NUGENT, C.; WARDLEY-RICHARDSON, T.; CHIN, Y.L. Plant regeneration from stem and petal of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **Plant Cell Reports**, v.10, n.9, p.477-480, Nov. 1991.
- OHIRA, K.; OJIMA, K.; FUJIWARA, A. Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. **Plant Cell Physiology**, v.14, n.6, p.1113-1121, Dec. 1973.
- OKUDA, T. Flores: atividade em expansão. **Revista Frutas & Legumes**, n.3, p.22-26, mar./abr. 2000.
- OLIVETTI, M.P.A.; TAKAES, M.; MATSUNAGA, M. Perfil da produção das principais flores de corte no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v.24, n.7, p.31-54, jul. 1994.
- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I. K. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and, cryopreservation**. Orlando: Academic Press, 1985. v.1, p.129-147.

PASQUALETO, P.L.; ZIMMERMANN, R.H.; FORDHAM, I. The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivars *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.14, n.1, p.31-40, 1988.

PETRU, E.; LANDA, Z. Organogenesis in isolated carnation plant callus tissue cultivated *in vitro*. **Biologia Plantarum**, v.16, n.6, p.450-453, 1974.

PIERIK, R.L.M. ***In vitro* culture of higher plants**. 3.ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. 344p.

PIMENTEL, M. O caminho das pedras. **Panorama Rural**, n.11, p.18-20, jan. 2000.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Nobel, 1990. 468p.

RADOJEVIC, L.; DJORDEJEVIC, N.; PETROVIC, J. *In vitro* culture techniques for carnation breeding. **Acta Horticulturae**, n.280, p.163-168, 1990.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of plants**. 5.ed. New York: Worth Publishers, 1992. 791p.

REID, D.A.; LOTT, J.N.A.; ATTREE, S.M.; FOWKE, L.C. Mineral nutrition in white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) seeds and somatic embryos. I phosphorus, phytic acid, potassium, magnesium, calcium, iron and zinc. **Plant Science**, v.141, n.1, p.11-18, Feb. 1999.

REINERT, J.; TAZAWA, M.; SEMENOFF, S. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis *in vitro*. **Nature**, v.216, p.1215-1216, 1967.

ROBERTS, A.W.; HAIGLER, C.H. Tracheary-element differentiation in suspension-cultured cells of *Zinnia* requires uptake of extracellular Ca^{2+} . **Planta**, v.180, n.4, p.502-509, Mar. 1990.

- ROEST, S; BOKELMANN, G.S. Vegetative propagation of carnation *in vitro* through multiple shoot development. **Science Horticulturae**, v.14, n.4, p.357-366, Apr. 1981.
- ROUX, J.M.; PARISOT, E.; MARCHAL, J. Mineral nutrition of micropropagated strawberry plants during acclimatization ex vitro. **Fruits**, v.44, n.5, p.275-279, 1989. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1987-1989/
- RUFFONI, B.; MASSABO, F. Suspension cultures of *Dianthus caryophyllus* cell. **Acta Horticulturae**. Carnation Culture, n.301, p.251-263, Jan. 1992.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopatologica**, v.1, n.3, p.231-233, 1975.
- SCHONS, J.; BRASIL, O.G. Poliaminas na embriogênese somática em cenoura (*Daucus carota* L.). **Scientia Agrícola**, v.52, n.3, p.534-53, set./dez. 1995.
- SHABDE, M.; MURASHIGE, T. Hormonal requirements of excised *Dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem *in vitro*. **American Journal of Botany**, v.64, n.4, p.443-448, Nov./Dec. 1977.
- SIQUEIRA, W.J. Cultura de tecidos. Separata de **O Agrônomo**, v.38, n.1, p.25-30, jan./abr. 1986.
- SMORIGO, J. N. Análise da eficiência dos sistemas de distribuição de flores e plantas ornamentais no estado de São Paulo. Piracicaba, 2000. 132p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- 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.
- STAFFORD, A.; WARREN, G. **Plant cell and tissue culture**. Melksham: Red Wood Press, 1991. 251p.
- STONE, O.M. Factors affecting the growth of carnation plants from shoot apices. **Annals Applied Biology**, v.52, p.199-209, 1963.
- TAGLIAVINI, M.; BASSI, D.; MARANGONI, B. Growth and mineral nutrition of pear rootstocks in lime soils. **Scientia Horticulturae**, v.54, n.1, p.13-22, Apr. 1993.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates , 1998. 792p.
- TAKANE, R.J. Micropropagação e aclimação de mosquitinho, *Gypsophila paniculata* L. cv. Bristol Fairy (Caryophyllaceae). Piracicaba, 1997. 47p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- THORPE, T.A.; PATEL, K.R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, I. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. v.1, cap.7, p.49-60.
- TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, CNPH, 1998. v.1, p.133-145.

TORREY, J.G.; REINET, J. Suspension cultures of higher plant cell in synthetic media. **Plant Physiology**, v.36, p.483-491, 1961.

VEASEY, E.A.; VIEIRA, M.L.; BANDEL, G. Tissue culture in *Gramineae*, with emphasis on forage grasses. **Ciência e Cultura**, v.43, n.1, p.36-43, jan./feb. 1991.

VIDALIE, H. **Produccion de flores y plantas ornamentales**. Madrid: Mundi-Prensa, 1983. 263p.

VILLA-LOBOS, V. Floral differentiation in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from anthers cultured *in vitro*. **Phyton**, v.41, n.1, p.71-75, Jan. 1981.

WERKER, E.; LESHEM, B. Structural changes during vitrification of carnation plantlets. **Annals of Botany**, v.59, n.4, p.377-385, Apr. 1987.

WETHERELL, D.F.; DOUGALL, D.K. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. **Physiologia Plantarum**, v.37, p.97-103, 1976.

WINSOR, G; ADAMS, P. **Glasshouse crops**: diagnosis of mineral disorders in plants. London: Her Majesty's Stationery Office, 1987. 168p. 3v.

WYN JONES, R.G.; POLLARD, A. Proteins, enzymes and inorganic ions. In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R.L. (Ed.) **Inorganic plant nutrition**. Berlin: Springer-Verlag, 1983. cap.4.3, p.528-562. (Encyclopedia of Plant Physiology, 15B).

WYN JONES, R.G.; BRADY, C.J.; SPEIRS, J. Ionic and osmotic relations in plant cells. In: LAIDMAN, D.L.; WYN JONES, R.G. (Ed.) **Recent advances in the biochemistry of cereals**. London: Academic Press, 1979. p.63-103.

YANTCHEVA, A; VLAHOVA, M.; ANTANASSOV, A. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) **Plant Cell Reports**, v.18, n.2, p148-153, Nov. 1998.