

JOÃO MANETTI FILHO

Tolerância de Tecidos de Cenoura (Daucus
carota L.) a níveis elevados de Manganês.
Indução e Seleção.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da UNICAMP para a
obtenção do título de Mestre
em Biologia.

Orientador: Prof. MARO RAN-IR SÖNDAHL

Aos meus Pais,

Esposa e Filhos

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. MARO RAN-IR SONDAHL, pela orientação, apoio e dinamismo, contribuindo decisivamente para a realização deste trabalho científico.
- Aos Professores ANTONIO CELSO NOVAES DE MAGALHÃES, LADASLAV SÓDEK e ROLF DIETER ILLG, pelas sugestões feitas a este trabalho.
- Ao Instituto Agronômico de Campinas pela concessão do estágio de treinamento junto ao laboratório de cultura de tecidos da Secção de Genética, possibilitando a realização deste trabalho experimental.
- Ao Instituto Agronômico do Paraná pela oportunidade de realizar este treinamento.
- A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo auxílio financeiro de complementação.
- A SIRLEI APARECIDA FRANCISCO, SÔNIA APARECIDA FERRAZ DE CAMPOS, MARLENE MACARELLI DE GODOY E ADEMIR BENATI pelos serviços de Laboratório.
- A IONE SALGADO MARTINS pela amizade e apoio.
- Ao Acadêmico PAULO ROBERTO CIELO pela colaboração prestada nos serviços de Laboratório.
- À Seção de Hortaliças diversas pelo fornecimento do Material Vegetal, especialmente ao Dr. JOÃO BAPTISTA FORNASIER.
- À MARIA EUGÊNIA DE ALMEIDA, MARICÉLIA DE FATIMA COSTA e ELIANE DE FATIMA ORTOLAN LEAL pelos serviços de datilografia.
- À todos que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho e com minha formação profissional.

ÍNDICE

	PÁGINA
I - INTRODUÇÃO	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. Manganês na Planta	4
2. Toxicidade de Manganês	5
2.1. Interação de Mn/Fe	6
2.2. Interação de Mn/Zn	6
2.3. Interações de Manganês com Cálcio, Magnésio, Fósforo e Silício	8
2.4. Influência de Mn sobre "Rhizobium"	9
2.5. Complexos Orgânicos de Manganês	10
3. Expressividade Gênica	10
4. Mutagênicos	11
4.1. Mutação de Celulas em Cultura	12
III - MATERIAIS E MÉTODOS	16
1. Material Vegetal	16
2. Exterilização Externa do Material Vegetal	18
3. Meios de Cultura Sólidos para Indução de Calos	20
4. Cultura Líquida para Células em Suspensão	21
5. Metodologia de Cultura de Celulas para Testes de Mn <u>in vitro</u>	22
5.1. Meios Sólidos para Transferência de Células Provenientes de Meio Líquido	22
5.2. Fontes de Manganês	23
5.3. Variação do pH Inicial	25

6. Diferenciação Somática	27
7. Interação de IAA com Manganês	27
8. Seleção de Clones Celulares Tolerantes ao Excesso de Mn	28
8.1. Reação de Seis Cultivares ao Excesso de Manganês	28
8.2. Indução e Seleção de Clones Mutantes	28
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
1. Esterilização Externa do Material Vegetal	31
2. Região de Maior Proliferação de Calos	33
3. Meios de Cultura Sólidos para Indução de Calos	33
4. Cultura Líquida para Células em Suspensão	37
5. Aspectos de Metodologia para Testes de Mn <u>in vitro</u>	40
5.1. Meios Sólidos para Transferência de Células Provenientes de Meio Líquido	43
5.2. Fontes de Manganês	46
5.3. Variação de pH	55
5.4. Meio de Murashige e Skoog Modificados	57
5.5. Esterilização dos Meios de Cultura	59
6. Diferenciação Somática	61
7. Interação de IAA x Mn	63
8. Seleção de Clones Celulares Tolerantes ao Excesso de Mn	66
8.1. Tolerância de Seis Cultivares de Cenoura ao Gradiente de Concentração de Manganês	66
8.2. Indução e Seleção de Clones Mutantes	70

V	- CONCLUSÕES	81
VI	- RESUMO	84
VII	- SUMMARY	86
VIII	- BIBLIOGRAFIA	88

INDICE DE FIGURAS

PÁGINA

- Fig. 1 - Padrões de crescimento de calos, a partir dos explantes inicial de raiz de cenoura, utilizados como escala de notas (1 a 5) para a avaliação visual de crescimento, após 28 dias de cultura 24
- Fig. 2 - Segmentos de 5 x 5 mm de papel de filtro Whatman nº 1, contendo uma camada de células provenientes de cultura líquida, após filtração a vácuo em funil de Buchner, em condições assépticas. 24
- Fig. 3 - Aliquotas de 4×10^6 células de cenoura (cultivar II), suspensas em 50 ml de meio líquido contendo 10^{-5} M de etil metano sulfonato (EMS) durante 6 horas em agitador (70 rpm) 34
- Fig. 4 - Proliferação de calos na região do floema secundário em seção transversal de raízes de cenoura (cultivar II), após 35 dias em meio MS-C, Kin ($1 \mu\text{M}$) e 2,4-D ($5 \mu\text{M}$)..... 34
- Fig. 5 - Indução de calos de cenoura cultivares (I, II, III e IV), a partir de explantes da região do floema secundário de raiz, em experimento dialélico contendo cinco concentrações de ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinco con

dos por índice de crescimento e expressos em porcentagem sobre o maior índice de crescimento ...

35

Fig. 6 - Indução de calos de cenoura cultivares (V, VI, VII e VIII), a partir de explantes da região do floema secundário de raiz, em experimento dialético contendo cinco concentrações de ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinco concentrações de cinetina (Kin). Dados avaliados por índice de crescimento e expressos em porcentagem sobre o maior índice de crescimento.

36

Fig. 7 - Indução de calos de cenoura cultivares (I, II, III, IV), a partir de explantes da região do floema secundário de raiz, em experimento dialético contendo cinco concentrações de ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinco concentrações de cinetina (Kin). Dados expressos em peso fresco (gramas)

38

Fig. 8 - Indução de calos de cenoura cultivares (V, VI, VII e VIII), a partir de explantes da região do floema secundário de raiz, em experimento dialético contendo cinco concentrações de ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinco concentrações de cinetina (Kin). Dados expressos em peso fresco (gramas)

39

Fig. 9 - Células em suspensão de cenoura (cultivar I) após 28 dias de cultura em meio MS-C suplementado com

traços iniciais de células: (A) 10^3 células/ml; (B) 10^4 células/ml; (C) 10^5 células/ml ..

41

Fig. 10 - Crescimento de células de cenoura (cultivar II) em meio líquido durante 17 dias, com adição periódica de 30% (do volume anterior) de meio MS-C fresco, suplementado com NAA ($10,0 \mu\text{M}$) e Kin ($2,5 \mu\text{M}$). Dados expressos em número de células/ml (—) e número total de células (-----).....

42

Fig. 11 - Crescimento de calos de cenoura (cultivar II) a partir de células em suspensão após 28 dias de cultura em meio MS-C, contendo $2,5 \mu\text{M}$ Kin e os seguintes tratamentos de auxina: (1) $0,0 \mu\text{M}$ NAA; (2) $2,5 \mu\text{M}$ NAA; (3) $5,0 \mu\text{M}$ NAA; (4) $10,0 \mu\text{M}$ NAA; (5) $20,0 \mu\text{M}$ NAA; (6) $2,5 \mu\text{M}$ 2,4-D.

44

Fig. 12 - Crescimento de calos de cenoura (cultivar II) a partir de células em suspensão após 28 dias de cultura em 36 combinações dialéticas de Kin/NAA ($0,0$; $0,5$; $1,0$; $2,5$; $5,0$ e $10,0$ / $2,5$; $5,0$; $10,0$; $15,0$ e $20,0 \mu\text{M}$) em meio MS-C. Dados expressos em peso fresco de calos (média de 10 repetições).

45

Fig. 13 - Comparação de duas fontes de Manganês: MnCl_2 (—) e MnSO_4 (-----). Crescimento de calos (cultivar II) expressos em peso fresco

- Fig- 14 - Crescimento de calos (cultivar II) após 28 dias de cultivo em meio MS-C (NAA 10 μ M, Kin 2,5 μ M), na presença de duas fontes de Manganês ($MnCl_2$ e $MnSO_4$) após 28 dias de crescimento no escuro, a 24 - 28^o C. 49
- Fig. 15 - Concentração de Manganês em calos de cenoura (cultivar II), submetidos a duas fontes de Manganês ($MnSO_4$ — e $MnCl_2$ ----) num gradiente de concentração de 0,1; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0 e 20,0 mM, após 28 dias de cultivo no escuro, a 24 - 28^o C. 50
- Fig. 16 - Concentração de Manganês em calos de cenoura (cultivar IV), submetidos a duas fontes de Manganês ($MnSO_4$ — e $MnCl_2$ -----) num gradiente de concentração de 0,1; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0 e 20,0 mM, após 28 dias de cultivo no escuro, a 24 - 28^oC. 51
- Fig. 17 - Crescimento de calos (cultivar II) e valores de pH final médio do meio de cultura, em função de três concentrações de $MnCl_2$ (0,1; 4,0 e 8,0 mM). 56
- Fig. 18 - Crescimento de calos (cultivar II) na presença de concentrações crescentes de Manganês (meio MS-C), em função de três níveis de Fósforo, Cálcio e Magnésio. Nível A (0,125 mM P; 0,3 mM Ca e 0,75 mM Mg); Nível B (0,31 mM P, 0,75 mM Ca e 1,13 mM Mg) e Nível N (1,25 mM P; 3,0 mM Ca e

Fig. 19 - Crescimento de calos (cultivar II) na presença de um gradiente de Manganês, em meios de culturas submetidos a dois processos de esterilização: (A) autoclave (120⁰ C, 1,0 atmosfera, 20 minutos, —) e (B) Filtro de membrana Millipore (0,45 µm -----). Dados expressos em peso fresco de calos, após 28 dias de crescimento no escuro a 24 - 28⁰ C .

62

Fig. 20 - Calos (A), embriões somáticos (B) e plantletes (C) obtidos a partir de células em suspensão do cultivar II.

64

Fig. 21 - Crescimento de calos de cenoura (cultivar II) em interação dialética de 5 x 5 entre IAA (1,0; 15,0; 30,0; 45,0 e 60,0 µM) e de MnCl₂ (0,1; 2,0; 4,0; 8,0 e 12,0 mM). Dados expressos em peso fresco de calos, após 28 dias de cultura no escuro, a temperatura de 24 - 28⁰C.

65

Fig. 22 - Crescimento de calos dos cultivares II (—), IV (----) e VII (-.-.-) na presença de um gradiente de concentração de Manganês, em meio MS-Cm, suplementado com 10 µM NAA 2,5 µM Kin. Dados expressos em percentagem sobre o maior crescimento para cada cultivar (RC).

68

Fig. 23 - Concentração de Manganês em calos de três

gradiente de concentração $MnCl_2$ (0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,5; 2,0 e 8,0 mM) no meio de cultura. Dados expressos em partes por milhão (ppm).

69

Fig. 24 - Crescimento de calos (cultivar II) submetidos a diferentes concentrações de EMS (0,0; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} e 10^{-7} M) durante 6 horas. Dados de peso fresco expressos em gramas após 28 dias de cultivo no escuro a $24 - 28^{\circ} C$

72

Fig. 25 - Calos do cultivar II, obtidos a partir de células em suspensão testados com 10^{-5} M EMS/6 horas, após 28 dias de cultura em meio MS-C, $10 \mu M$ NAA e $2,5 \mu M$ Kin, na presença de um gradiente de concentração de Manganês (0,1 a 32 mM).

74

Fig. 26 - Crescimento de calos (cultivar II) submetidos a diferentes concentrações de EMS (0,0; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} e 10^{-9} M) durante 6 horas. Dados de peso fresco expressos em gramas após 28 dias de cultivo no escuro a $24 - 28^{\circ} C$...

76

Fig. 27 - Clones celulares (cultivar II) submetidos a tratamento de 10^{-5} M EMS durante 6 horas, e posterior cultivo em meio MS-Cm ($10,0 \mu M$ NAA; $2,5 \mu M$ Kin) durante 60 dias no escuro a temperatura de $24 - 28^{\circ} C$.

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Tratamentos de esterilização externa de raízes de cenoura e percentagem de contaminação após 3 dias de incubação no escuro, em meio sólido	32
TABELA 2 - Comparação de duas fontes de Manganês, Sulfato e Cloreto, na faixa de concentração de 0,1 a 32,0 mM. Valores em peso fresco de calos de cenoura (Cultivar II), após 28 dias em cultura	47
TABELA 3 - Concentração de nutrientes em calos de cenoura (cultivar II) na presença de duas fontes de Manganês (Sulfato e Cloreto). Dados expressos em ppm.	53
TABELA 4 - Concentração de nutrientes em calos de cenoura (cultivar IV) na presença de duas fontes de Manganês (Sulfato e Cloreto). Dados expressos em ppm	54
TABELA 5 - Crescimento de calos de cenoura (cultivar II) em função de diferentes valores de pH inicial (4,0; 4,25; 4,50; 4,75; 5,00 e 5,50) e valores de pH final após 28 dias de cultura. Dados em Peso Fresco (P.F.) expressos em gramas. média de 10 repetições	58

TABELA 6 - Média de peso fresco (P.F.) de calos e Relação de Crescimento (R.C.: tomando o máximo crescimento de cada cultivar igual a 100%) de cinco cultivares de cenoura submetidos ao gradiente de concentração de Manganês em meio MS-C, após 28 dias de cultura no escuro 67

TABELA 7 - Crescimento de calos de cenoura (cultivar II) submetidos a diferentes concentrações de EMS ($0,0$; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} e 10^{-7} M) durante 6 horas. Dados de Peso fresco (P.F.) expressos em gramas após 28 dias de cultivo no escuro e Relação de Crescimento (R.C.), tomando o peso fresco de controle igual a 1,0. 73

TABELA 8 - Crescimento de calos de cenoura (cultivar II) submetidos a diferentes concentrações de EMS ($0,0$; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} e 10^{-9} M) tratadas durante 12 horas. Dados de Peso Fresco (P.F.) expressos em gramas após 28 dias de cultivo no escuro e Relação de Crescimento (R.C.) tomando o peso fresco do controle igual a 1,0. 75

TABELA 9 - Número de colônias (calos) do cultivar II, formados após tratamento com 10^{-5} M EMS por 6 horas cultivadas em meio MS-C, durante 60 dias, submetidas a um gradiente de concentração de Mn^{+2} 79

I - INTRODUÇÃO

Manganês é um dos elementos metálicos mais abundantes na crosta terrestre. Sua presença está ligada a alterações complexas, envolvendo atividade física, química e biológica entre suas várias formas de ocorrência. As formas químicas dominantes são óxidos e hidróxidos. A disponibilidade de Manganês para as plantas é determinada por características próprias de cada solo: a) concentração total de Manganês, sua solubilidade e quantidade da fração redutível; b) pH; c) concentração total de sais; d) capacidade de troca catiônica; e) quantidade de matéria orgânica; f) drenagem; g) compactação; h) temperatura; e i) atividade microbiológica. A absorção de Manganês pelas plantas sofre a influência de vários fatores: temperatura do solo e/ou ar, umidade do solo, intensidade luminosa e interação com outros elementos químicos presentes no solo e na planta. Todos estes fatores determinam se a concentração de Manganês será deficiente, adequada ou excessiva para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Committee on Biologic Effects of Atmospheric Pollutants, 1973). Além destes aspectos, as espécies vegetais diferem em exigência, capacidade de acúmulo e tolerância a Manganês nos tecidos (Hewitt, 1948; Jackson, 1967).

Os solos tropicais e subtropicais úmidos apresentam teores elevados de Alumínio e Manganês disponíveis, associados a valores baixos de pH. Um levantamento sobre a distribuição de Manganês nos solos do Estado de São Paulo, realizado por Paiva Neto, (1941), revelou teores até $1,1 \text{ meq Mn}^{+2}$ em terra roxa legítima.

As condições de pH ácido favorecem o acúmulo de Alumínio e Manganês, devido ao aumento de solubilidade abaixo de pH 5,5 (Adams e Wear, 1957; Foy, 1973; Foy, et al. 1973; Foy, 1978). Além disso, níveis tóxicos de diversos metais podem ocorrer devido ao

Todas estas condições que favorecem a ocorrência de níveis tóxicos de Manganês contribuem para uma menor produtividade agrícola. Torna-se necessário adequar o solo às condições favoráveis ao crescimento e desenvolvimento vegetal, através da calagem ou, inversamente, desenvolvendo novas variedades capazes de tolerar situações extremas de disponibilidade de metais na solução do solo.

Os altos teores de Manganês comumente encontrados em solos de origem basáltica do Brasil provocam problemas de toxicidade de Manganês, podendo induzir deficiência de alguns micronutrientes, especialmente em plantas perenes, tais como café e citrus.

A obtenção de novas fontes de variabilidade é um objetivo constante em todo o programa de melhoramento de plantas. Os métodos de indução e seleção de mutantes são vários, existindo, entretanto, limitações sobre o número total de plantas a serem utilizadas e o espaço experimental disponível.

A metodologia atual de cultura de células de plantas superiores permite a utilização das várias técnicas de genética de microorganismos, com a possibilidade potencial de regeneração de novas plantas, explorando a totipotência das células vegetais. Um número proibitivo de plantas seria necessário para obter a mesma resolução de uma única placa de Petri contendo células vegetais em multiplicação. O emprego de mutagênicos físicos ou químicos permite a indução e seleção in vitro de células mutantes em alta frequência.

Este trabalho tem por objetivo a utilização da técnica de cultura de células para indução e seleção de cultivares de cenoura tolerantes a níveis elevados de Manganês em meios sólidos

mente para plantas perenes, desde que as técnicas de cultivo in vitro estejam bem desenvolvidas para a espécie de interesse agrícola.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Manganês na Planta

O Manganês é um micronutriente essencial para as plantas (Mozé, 1936). Ele satisfaz tanto aos critérios diretos como indiretos de essencialidade (Arnon, 1950).

Os processos metabólicos onde o Manganês está envolvido são vários. Segundo Gerretsen (1950) o Manganês atua na transferência do elétron fotoinduzido no mecanismo de decomposição da molécula de água. O autor sugere ainda que o Mn^{+2} , isolado ou preso a um carreador, associasse com radicais OH^- , dando origem a molécula de H_2O_2 , que se decompõe rapidamente em água e oxigênio livre.

A hipótese amplamente aceita a respeito do papel do Mn^{+2} na fotossíntese é como catalizador na cadeia de reações que liberam oxigênio do fotossistema II (Pirson, 1937; Pirson et al., 1952; Kessler, 1955; 1957; Brown et al., 1958; Eyster et al., 1958; Spencer e Possingham, 1961; Possingham e Spencer, 1962; Bachofen, 1966; Chaniae e Martin, 1966; Gerhardt, 1966; Mckenna e Bishop, 1967; Homann, 1967; Habermann et al., 1968; Chaniae e Martin, 1969). A reação de Mehler (uma reação de Hill) é estimulada por Mn^{+2} (Habermann, 1969).

Sob condições de deficiência de Mn^{+2} , Chaniae e Martin (1969) demonstraram com células de Anacystis nidulans a necessidade de Mn^{+2} em presença de luz, para formar os centros ativos de liberação de Oxigênio.

Teichler - Zallen (1969) mostrou a atividade do Man

Além destes aspectos ligados a fotossíntese o Manganês ativa enzimas em outros processos metabólicos. Folley e Greenbaum (1948) demonstraram que Mn^{+2} ativa a arginase, na conversão de arginina em ureia e ornitina. Manganês é também ativador de Beta-carboxilases na fixação de CO_2 , formando ácidos di e tricarbônicos. Vennesland e Felscher, 1946; Gollub e Vennesland, 1947, Speck, 1949, demonstraram que Manganês ativa o processo de fixação de CO_2 pela enzima oxaloacetato carboxilase de raízes de salsa, enquanto que, Elliott (1953) demonstrou a necessidade de Mn^{+2} para atividade da glutamato transferase em tecidos de ervilha.

O Manganês é absorvido pelas plantas na forma Mn^{+2} presente na solução do solo, porém ele ocorre ainda nos solos sob as formas tri e tetravalentes. Dependendo das condições do meio ambiente pode haver um aumento da disponibilidade de Mn^{+2} , chegando a níveis tóxicos ao crescimento e desenvolvimento das plantas.

2. Toxicidade de Manganês

O Manganês é o micronutriente mais abundante na natureza depois do Ferro. O teor de Manganês total nos solos brasileiros pode variar de 10 a 4.000 ppm, e o teor solúvel (em acetato de amônio) varia de 0,1 a 100 ppm. O Manganês ocorre no solo como óxidos e hidróxidos com solubilidade muito diversa. Ele ocorre nos solos em três estados de valência: a) divalente, Mn^{+2} , presente como cationio adsorvido ou solúvel na solução do solo, sendo esta a forma absorvida pelas plantas; b) trivalente, suposto como óxido altamente reativo e c) tetravalente, óxido muito inerte (Malavolta, 1980).

A disponibilidade a forma Mn^{+2} para as plantas depend

tores pode ocasionar excesso de absorção ou toxicidade nas plantas.

O excesso de Manganês pode alterar a absorção de outros ions ou imobilizá-los dentro da célula.

2.1. Interação de Mn/Fe

O excesso de Manganês afetando o crescimento da planta tem despertado a atenção de pesquisadores desde o início do século. Tottinghan e Beck (1916) já mostraram que o excesso de Manganês afetava o crescimento de plantas de trigo, exercendo antagonismo na absorção de Ferro. Mais tarde Hopkins (1930) sugeriu que o Manganês agia no controle da passagem do ion ferroso a férrico. Somers e Shive (1942), trabalhando com soja, encontraram relação Fe/Mn ótima entre 1,5 a 2,5. Quando essa relação ultrapassava a 2,5 apareciam sintomas de deficiência de Manganês ou toxidez de Ferro ou ambos. Se a relação fosse inferior a 1,5 apareciam sintomas de deficiência de Ferro ou toxidez de Manganês ou ambos. Lee (1972) reportou que o excesso de Manganês induziu deficiência de Ferro em tomate cultivado em solução nutritiva, quando a relação Fe/Mn na parte aérea era de 1/8 ou ainda maior. Foy (1963) encontrou máxima produção de alfafa quando a relação Fe/Mn na parte aérea era 2,73/1 e apenas 25% dessa produção foi conseguida quando a relação passou para 0,13/1.

2.2. Interação de Mn/Zn

Arzola (1955) demonstrou em folhas de café que o aumento da concentração de Manganês em solução nutritiva, provocou uma diminuição de aproximadamente 50% da absorção de Zinco⁶⁵. Peralta, citado por Sylvain (1954), constatou que a doença de café chamada

tração cinco vezes maior de Manganês nas plantas anormais. Pavan (1979) encontrou decréscimo no teor de Zinco em folhas de café quando os níveis de Manganês e Níquel, foram aumentados na solução nutritiva. Juang (1973) encontrou evidências em cana-de-açúcar de que solos contendo alto nível de Manganês, requeriam maior nível de Zinco para ótimo crescimento.

Como íons Zinco são requeridos para síntese do triptofano, precursor de ácido Indol Acético (IAA), a partir de serina e núcleo de purina (WILDMAN et al., 1947; Tsui, 1948 e Sherwin e Purves, 1969), o excesso de Mn^{+2} pode levar a deficiência de Zn e conseqüentemente a falta de IAA. Salami e Kenefick (1970) cultivaram milho em solução nutritiva sem Zinco. As plantas cresceram mal e apresentaram sintomas de deficiência de Zinco. Com a adição de zinco ou triptofano na solução, os sintomas de deficiência desapareceram, evidência indireta de que Zinco é necessário para síntese deste amino ácido.

Além do excesso de Manganês prejudicar a síntese de IAA, acelera a sua degradação, ativando enzimas do sistema IAA-oxidase. Morgan et al., (1966) reportaram que 81 mg de Manganês por litro de solução induziu severo sintoma de toxicidade de Manganês em algodão. Associado a esse nível tóxico de Manganês, aqueles autores encontraram um aumento da atividade do sistema IAA-oxidase e diminuição da atividade do sistema inibidor do sistema IAA-oxidase. Eles concluíram que o sintoma de toxicidade de Manganês em algodão era expressão da deficiência de auxina.

Stonier et al., (1968) demonstraram que em presença do oxigênio o Manganês acelerava a inativação do IAA em Convolvulus japonicus. Eles sugeriram que essa inativação ocorreu por dois caminhos metabólicos distintos: a) o Manganês catalizava a oxida

ção de IAA através do peroxidases endógenas. Wagenknecht e Burris (1950) demonstraram que durante a oxidação de IAA ocorria o desprendimento de CO_2 e o consumo de O_2 em quantidades estequiométricas semelhantes. Dois cofatores eram necessários para atividade enzimática, ions Manganês e um composto fenólico. Ray (1962) sugeriu que o Manganês seria um transportador de eletrons entre a enzima e o cofator fenólico. Meudt (1971) reportou que o Manganês acelerava a reação induzida por sulfito durante a auto oxidação enzimática de IAA. O autor sugeriu que o Manganês devia funcionar na transferência de eletrons entre o sulfito e radicais livres de IAA, enquanto Waigood et al., (1956) demonstraram que o Manganês podia oxidar diretamente IAA com desprendimento de CO_2 .

2.3. Interações de Manganês com Cálcio, Magnésio, Fósforo e Silício

Tem sido demonstrado interferência de vários cátions na absorção de Manganês. Ouellette e Dessureaux (1958) mostraram que o aumento da concentração de Cálcio em solução nutritiva reduzia a toxicidade de Manganês. Outros autores também demonstraram que o aumento da concentração de Cálcio na solução diminuía a absorção de Manganês (Robson e Loneragan, 1970; Heenam e Carter, 1976; e Shuman e Anderson, 1976). Outros pesquisadores (Rees e Sedrak, 1961), atribuíram a tolerância a Manganês de alguns clones de alfafa à capacidade de absorver Cálcio e mantê-lo na forma solúvel. Os autores notaram ainda que Cálcio reduzia a absorção de Manganês pelas plantas.

Mass et al. (1969), utilizando raízes destacadas de cevada, verificaram que a presença de Magnésio diminuiu a absorção de

isoladamente não afetou a absorção de Manganês. Por outro lado, foi mostrado que Cálcio sozinho inibiu marcadamente a absorção de Manganês por células isoladas de folhas de fumo (Kannan, 1969). O Fe^{2+} também inibiu severamente a absorção de Manganês (Kannan, 1969). Bowen (1969) mostrou que a absorção de Manganês por tecidos de folha de cana era maior na ausência de Cálcio mas concluiu que o fato era devido a perda de integridade da membrana e uma subsequente entrada de Manganês. Na ausência de Cálcio havia uma rápida entrada de Manganês nos primeiros 30 minutos, mas a subsequente entrada de Manganês era nula. Na presença de Cálcio, a absorção de Manganês era linear para um período de tempo superior a duas horas.

Bortner (1935) sugeriu que Fósforo devia reduzir a toxicidade de Manganês por inativá-lo dentro da planta. Heitze (1968) concluiu que Fósforo detoxifica Manganês por precipitá-lo dentro das raízes da planta na forma de compostos de Fósforo-Manganês.

Há várias evidências de que Silício solúvel protege as plantas contra a toxicidade de Manganês (Foy et al. 1978). Lewin e Heinann (1969) mostraram que plantas deficientes em Silício acumulam maior concentração de Manganês que as plantas com teor maior de Silício. A maior absorção de Silício pelas monocotiledôneas em relação às dicotiledôneas poderia explicar a maior tolerância de Manganês nas monocotiledôneas.

2.4. Influência de Manganês sobre Rhizobium

O excesso de Manganês está associado também com processos de fixação simbiótica de Nitrogênio. Dobereiner (1966) sugeriu que a suscetibilidade de muitas leguminosas a solos ácidos pode ser explicada pela toxicidade específica de Manganês para pro

guminosas tropicais, havendo diferença entre as espécies.

2.5. Complexos Orgânicos de Manganês

A formação de complexos orgânicos com Manganês tem sido sugerida para explicar detoxificação desse micronutriente. Sutcliffe (1962) sugeriu que a formação de complexos orgânicos na raiz poderiam reduzir o transporte de Manganês para a parte aérea. Tiffin (1967) encontrou Manganês ligado a compostos orgânicos solúveis em exudatos de xilema de tomate quando a concentração de Manganês era elevada. Hofner (1970) reportou uma associação entre Manganês com amino ácidos em exudatos de girassol. Bremner e Knight (1970) e Bremner (1974) não encontraram complexos orgânicos com Manganês em centeio, porém Cobre e Zinco ocorreram na forma complexa. Van Goor e Wiersma (1974, 1976) reportaram que o Manganês apresentava-se associado com compostos orgânicos com peso molecular entre 1000 e 5000. Dieckert e Rozacky (1969) isolaram uma proteína de sementes de amendoim, com peso molecular de 56.300, contendo um átomo de Manganês. Hiatt (1967) demonstrou que a absorção em excesso de um ion é compensada por variações no teor de ácidos orgânicos.

Apesar dessas evidências Foy, et al. (1978) sugerem que a formação de complexos orgânicos com Manganês não deve ser um mecanismo importante para detoxificar Manganês nas plantas.

3. Expressividade Gênica

A utilização da cultura de células vegetais com a possibilidade de selecionar variantes tolerantes a condições adversas do meio ambiente, incluindo a resistência ao frio, a seca, alta concentração de sais e outros, tem sido sugerida desde a década de 1950 (Melchers e Bergman, 1959).

ao nível celular em 17 espécies. Plantas foram regeneradas de 20 fenótipos e a transmissão sexual de caracteres selecionados ocorreu em 10 a 11 casos. Dentre estes fenótipos encontramos variantes resistentes a: Streptomicina (Binding, 1972); 5-bromodeoxiuridina (Maliga et al. 1973; Ohyama, 1974); análogos de amino ácidos (Widholm, 1972b; Carlson, 1973; Palmer e Widholm, 1975; e Widholm, 1976); toxina de fungos (Gengembach e Green, 1975); salinidade (Nabors et al., 1975; Dix e Street, 1975), temperatura baixa (Dix e Street, 1976), amino ácidos auxotróficos (Carlson, 1970); linha gem de células com absorção de nitrato aumentada (Heimer e Filner, 1970); tolerância a Alumínio (Meredith, 1978) e outros.

Wu e Antonovics (1978) induziram calos de cultivares tolerantes e sensíveis a Zinco e Cobre de Agrotis stolonífera, L. e demonstraram que a tolerância a ambos foi mantida em cultura de tecidos, sendo esta tolerância determinada geneticamente e atuando ao nível de célula. Um outro exemplo de expressividade gênica de células para plantas e vice-versa, foi descrito por Helgenson et al. (1976). Tecidos de plantas de fumo susceptíveis e tolerantes a Phytophthora parasitica raça 0 foram cultivadas in vitro e as plantas derivadas mantiveram as mesmas características de resistência e suscetibilidade a este patógeno. Células e plantas de geração F₁, F₂ e F₃ apresentaram as mesmas reações indicando que o gene (fator) dominante que confere resistência, tem expressividade in vitro (células) e in vivo (planta).

4. Mutagênicos

Durante os processos metabólicos normais de um organismo, cada reação bioquímica é catalizada por uma enzima e cada enzima é codificada por um ou mais genes. Se uma mutação produz

mutação pode ser definida como um evento que dá origem a uma alteração hereditária do genótipo (Levine, 1962).

As mutações são divididas em duas grandes classes, uma envolvendo a estrutura ou número de cromossomos e outra envolvendo alterações em um único gene. Estas mutações de um único gene são classificadas como mutações gênicas ou de ponto e aquelas que envolvem alterações na estrutura ou número de cromossomos são classificados como mutações cromossômicas ou aberrações. Há duas grandes classes de aberrações cromossômicas: primeiro envolvendo mudanças no número de cromossomos e segundo aquelas mudanças na estrutura cromossômica que resultam em alterações na ordem e número de genes.

Mutações podem ocorrer espontaneamente, sem causa conhecida, ou serem induzidas por agentes mutagênicos físicos ou químicos. As chamadas mutações espontâneas são provavelmente causadas por agentes químicos ou físicos. Estas mutações espontâneas são de ocorrência rara para um determinado gene, porém acumulam-se em populações ao longo de várias gerações. Por outro lado, o emprego de mutagênicos físicos ou químicos permite o aumento da taxa de mutação.

Dentre os mutagênicos químicos, os agentes alquilantes são considerados mais eficientes. Estes compostos caracterizam-se pela transferência de grupamentos alquil às macromoléculas de ácido desoxiribonucleico (DNA) responsáveis pela manutenção do código genético. Fazem parte deste grupo de mutagênicos o gás mostarda, etileno imina, etil metano sulfonato, metil metano sulfonato, nitroso guanidina, dietilsulfato e outros. O etil metano sulfonato (EMS) apresenta a seguinte fórmula química $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-S}^{\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \text{O} \end{smallmatrix}}\text{-CH}_3$.

4.1. Mutação de Células em Cultura

de seleção de mutantes ao nível celular. Seleções positivas e negativas vêm sendo empregadas em células em cultura, ou seja, usando condições que favoreçam o tipo de mutante ou inversamente, eliminando o clone natural por condições letais do meio de cultura.

CARLSON (1970) obteve seis clones mutantes auxotróficos em tabaco, incluindo deficiências em ácidos nucleicos, vitaminas e aminoácidos. O mesmo autor (CARLSON 1973) selecionou clones celulares resistentes ao análogo de aminoácido sulfoxi-metionina, o qual é estruturalmente similar a uma toxina produzida por Pseudomonas tabaci. Plantas derivadas deste clone mutante apresentaram características de um único locus semi-dominante e sintomas muito reduzidos da doença quando inoculados com o patógeno. Este aspecto pode ser explorado em qualquer caso onde a toxina é conhecida, podendo então ser usada como agente de seleção.

WIDHOLM (1972 a) vem isolando uma série de clones mutantes em tabaco e cenoura a análogos de aminoácidos. O procedimento é simples: células em suspensão são transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura, o análogo de aminoácido e agar. Qualquer célula que multiplicar é considerada um possível mutante (variante). Outro aspecto muito útil seria a utilização de mutantes visando à qualidade do produto final. WIDHOLM (1972 a, b) isolou em tabaco clones resistentes a análogo de triptofano (DL-5 metil triptofano). Este clone mutante tem 18 vezes o nível normal de L-triptofano, aparentemente devido a presença de uma enzima alterada, a qual está envolvida no controle de produto final na via sintética deste aminoácido. O resultado é a super produção deste aminoácido. Este aspecto talvez poderia ser explorado no caso das deficiências de lisina em milho e metionina em soja. No entanto, a solução pode não ser tão simples como parece, pois um alto teor de um determinado aminoácido pode não estar correspondentemente incorporado em pro

acumulado no desejado órgão, ou seja, na semente.

Linhas de células com fenótipo desejado podem ser selecionadas diretamente se o novo fenótipo tem uma vantagem para crescimento sob condições seletivas, ou se diferenças visuais são observadas, por exemplo, em casos de pigmentação. Resistência fenotípica, tal como resistência a antibióticos, análogos de aminoácidos ou para nível elevado de Metais, pode ser obtido por seleção direta. A simplicidade de seleção é a explicação porque muito das linhas reportadas têm resistência fenotípica (MALIGA, 1978).

Recentemente foi induzido calos de tecido meristemático da parte aérea e da ponta de raiz de um clone de gramínea Agrotis stolonífera tolerante a nível elevado de Zinco e Cobre e de um clone controle, não tolerante a nenhum dos metais. O crescimento de calos em meio contendo Zinco e Cobre mostrou que a tolerância a ambos os metais era mantida em cultura de tecidos. O padrão de absorção do metal em cultura de tecido foi semelhante ao da planta toda; o tecido tolerante absorveu mais metal que o tecido não tolerante. As plantas regeneradas de calos tinham a mesma tolerância a Cobre e Zinco como as plantas de clone original, sem considerar o tempo de crescimento em cultura de tecido e origem do tecido de raiz ou parte aérea. Estes resultados suportam as evidências prévias que a tolerância a metais é geneticamente determinada e atua ao nível de célula (WU e ANTONOVICS, 1978).

Linhas de células de Nicotiana sylvestris e Capsicum annum, capazes de crescer em meio líquido contendo 1 e 2% de Cloreto de Sódio, foram obtidas. As células das linhas resistentes apresentaram um crescimento característico na presença de NaCl e, em certos casos, mostraram reter sua resistência ao sal, quando mantido por várias subculturas na ausência de NaCl (DIX e STREET, 1975).

chery" foram cultivados em meio de cultura contendo 200 e 400 micro molar de Alumínio. O crescimento das células de "Marglobe" foi completamente inibido após duas subculturas em meio contendo alumínio, enquanto que as células do cultivar "VFNT" foram parcialmente inibidas. Os tratamentos de 200 e 400 uM de alumínio não mostraram diferenças significativas de toxicidade em ambos os cultivares. Ambos os cultivares absorvem quantidades similares de alumínio, aparentemente atingindo um equilíbrio com o meio de cultura. Estes resultados mostram que a toxicidade de alumínio em tomate não é um fenômeno exclusivo dos tecidos intactos, ou seja, que diferenças genotípicas de tolerância ao alumínio podem ser expressas ao nível de células, em cultura de tecidos (MEREDITH, 1978).

Substâncias a serem usadas como agentes de seleção ficariam a cargo da imaginação e dos problemas específicos de cada cultura. Clones de células resistentes a específicos herbicidas poderiam ser também outra área de pesquisa e seleção. O importante aspecto a ser ressaltado aqui é que a seleção é feita ao nível celular e, portanto, permite o isolamento dentro de uma população aproximada de 10^6 células (1 milhão) por ml de cultura de células vegetais em suspensão, fato este bastante difícil em condições de campo. Note que usualmente um erlenmeier de cultura líquida contém 50 ml de células em suspensão.

Em resumo, a técnica de seleção a ser utilizada e a capacidade de regeneração de plantas ficam sendo os dois aspectos limitantes para se obter qualquer tipo específico de mutante através de cultura de células in vitro.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material Vegetal

Foram utilizadas raízes dos seguintes cultivares de cenoura (Daucus carota, L.), fornecidos pela Seção de Hortaliças Diversas do Instituto Agronômico de Campinas:

Cultivar I - Kuroda Gossun I - 3971 x Campinas IAC-3815 (F10)

Apresenta raízes de forma ligeiramente cônica, de coloração laranja intenso, interna e externamente. A duração do ciclo desde a sementeira à fase de consumo é aproximadamente 100 dias. O comprimento médio das raízes é 14 cm.

Cultivar II - Campinas IAC - 3815

Cultivar obtido através do cruzamento entre os cultivares Paraná I - 2709 e Meio Comprida Precoce IAC-2787. É um material bastante produtivo no Estado de São Paulo, quando semeado no período de março a setembro. A duração do ciclo varia de 100 a 115 dias. A raiz de formato ligeiramente cônico, apresenta um comprimento que varia de 12 a 16 cm, e a coloração é alaranjada interna e externamente. Esse cultivar apresenta tolerância a doença queima das folhas (Alternaria dauci).

Cultivar III - Campinas IAC - 3815 x Nantes Strong Top I-2840 (F15).

As raízes são de coloração alaranjada, forma ligeiramente cônica e comprimento médio de 12 cm. A duração do ciclo varia de 115 a 125 dias.

Material de procedência japonesa, adquiridos em esta belecimento comercial em Campinas (Casa das Sementes). A raiz apresenta coloração laranja-avermelhado, com duração do ciclo em torno de 115 dias. Este cultivar apresenta resistência a doença queima das folhas provocada por Alternaria dauci. Essa doença limita o cultivo de cenoura no verão. Esse cultivar é específico para cultivo nessa época.

Cultivar V - Tropical (OS)

Cultivar nacional desenvolvida pelo Instituto de Genética da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ) de Piracicaba. A raiz apresenta formato ligeiramente cônico, comprimento em torno de 15 a 20 cm, coloração externa alaranjada e interna vermelha. A duração do ciclo é de aproximadamente 100 dias. Esse cultivar apresenta resistência a Alternaria dauci sendo portanto recomendado para cultivo de verão.

Cultivar VI - Tropical (AS)

Cultivar nacional desenvolvida pelo Instituto de Genética da ESALQ com características semelhantes ao cultivar V.

Cultivar VII - Meio Comprida Precose IAC - 2787

Cultivar obtido através do cruzamento entre os cultivares Meio Comprida I - 1540 e Nacional I - 1870, ambos provenientes da empresa Merlo Braz do Rio Grande do Sul. A raiz apresenta coloração alaranjada, com forma cônica, comprimento médio em torno de 11 cm e a duração do ciclo varia de 90 a 105 dias.

Cultivar nacional desenvolvida pelo Instituto de Genética da ESALQ/USP com características semelhantes ao cultivar V.

Estes cultivares de cenoura utilizados neste trabalho fazem parte das gerações mais avançadas do programa de melhoramento desta espécie na seção de Hortaliças Diversas do Instituto Agronômico de Campinas. Eles apresentam características importantes para regularidade de produção de cenoura no Brasil tais como: resistência a Alternaria dauci, diferentes durações de ciclo, possibilidade de cultivo no verão e formato cilíndrico da raiz. Atualmente o cultivar importado Nantes é o de maior aceitação no mercado brasileiro, porém suscetível a maioria das doenças locais e cultivado somente nos meses mais frios do ano.

2. Esterilização Externa do Material Vegetal

Raízes adultas recém colhidas foram lavadas com detergente comercial e esponja em água corrente. Vários tratamentos de esterilização externa foram testados.

- A) Hipoclorito de Sódio Comercial* sem diluição, durante 30 minutos: Qboa.
- B) Hipoclorito de Sódio comercial sem diluição, durante 30 minutos: Super Cândida.
- C) Raspagem da epiderme da raiz - Hipoclorito de Sódio (Qboa) diluído a 50% com água esterelizada, durante 30 minutos.
- D) Etanol 70% durante 10 minutos - Hipoclorito de Sódio (Qboa) diluído a 30% durante 30 minutos.

- E) Raspagem da epiderme - Hipoclorito de Sódio (Qboa) diluído a 30%, durante 30 minutos.
- F) Raspagem da epiderme - Etanol a 70%, durante 10 minutos - Hipoclorito de Sódio (Qboa) diluído a 30%, durante 30 minutos.
- G) Etanol 70% durante 10 minutos - Hipoclorito de Sódio (Qboa) diluído a 50%, durante 30 minutos.
- H) Etanol 70% durante 10 minutos - Hipoclorito de Sódio (Qboa) diluído a 30%, durante 30 minutos.
- I) Flambagem uma vez - Hipoclorito de Sódio, diluído a 50%, durante 30 minutos.
- J) Flambagem tres vezes - Hipoclorito de Sódio, diluído a 50%, durante 30 minutos.

Após a realização dos tratamentos de esterilização superficial, as raízes foram lavadas três vezes em água esterilizada em condições assépticas. Utilizou-se câmara de fluxo laminar VECO modelo HLFS - 12 para todas as operações em condições estéreis. Discos transversais de aproximadamente sete milímetros de espessura, foram obtidos, cortando-se a raiz com bisturi. Destes discos foram extraídos cilindros de sete milímetros de altura e três milímetros de diâmetro (peso fresco médio de 8,06 mg) com furador de rolhas esterilizado, na região do floema secundário (Steward et al, 1964). Estes explantes foram incubados em placa de Petri contendo o seguinte meio sólido: solução salina de Murashige e Skoog (1962), pH 5,5, Sacarose (20 g/l), agar (8 g/l). Após três dias no escuro, foi avaliada a percentagem de contaminação. Os explantes viáveis e não contaminados foram transferidos para meio sólido definitivo, suplementado com cinetina (Kin; 1 μ M) e ácido 2,4- di

A composição salina utilizada (Macro e micronutrientes) no meio da cultura foi o de Murashige e Skoog (1962), baseando-se em dados anteriores para cultura de tecidos de cenoura (Caldas, 1971; Sangupta, 1978; Kamada e Harada, 1978). Os componentes orgânicos foram os seguintes: mio-inositol (550 μM), Tiamina (30 μM), Ácido Nicotínico (30 μM), Piridoxina (15 μM), Sacarose (20 g/l) e Agar (8 g/l). Este meio de cultura passamos a denominar de MS-C. O pH foi ajustado para 5,5 com KOH ou HCL após a adição de todos os componentes, antes da autoclavagem (1,0 atmosfera, 120° C, durante 20 minutos).

Após esterilização externa e lavagem com água esterilizada por três vezes, seções transversais de discos de raiz de cenoura, foram inoculados em meio de cultura sólido MS-C com Kin (1 μM) e 2,4-D (5 μM), a fim de avaliar a região de maior proliferação de calos. (Fig 4)

3. Meios de Cultura Sólidos para Indução de Calos

Para avaliar a(s) melhor(es) interação(ões) de reguladores de crescimento para a indução de calos nos cultivares utilizados, foram conduzidos experimentos dialélicos de 5x5 em meio sólido MS-C. Como fonte de auxina utilizou-se o 2,4-D nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 μM , e como fonte de citocinina, Kin, nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 μM . Cada experimento dialélico teve 25 tratamentos com 10 repetições, utilizando frascos quadrados de 50 ml, com 10 ml de meio sólido e tampa de latão com anel de vedação de borracha.

A avaliação de crescimento foi feita, após 28 dias de cultura no escuro, em temperaturas de 24 - 28° C, por meio de índice de crescimento (nota) e peso fresco de calos (gramas). No critério

tamentos foram avaliados quanto a cor e textura. Após atribuídas as notas, foi calculado um índice de crescimento (I.C.) através de uma fórmula empírica, originalmente utilizada por Sondahl(1978), a fim de melhor expressar o crescimento relativo dos calos:

$$I.C. = \frac{(nota\ 0) \times 0,2 + (nota\ 1) \times 1 + (nota\ 2) \times 2 + \dots + (nota\ 5) \times 5}{N^{\circ}\ \text{total de explantes}}$$

Após atribuídos os índices de crescimento, os dados foram transformados em percentagem em relação ao tratamento que apresentou o maior índice de crescimento, considerado como 100%.

4. Cultura Líquida para Células em Suspensão

Os calos obtidos nas melhores combinações hormonais, dos experimentos dialélicos (5 x 5) de cultura sólida, foram utilizados para obtenção de cultura líquida, com células em suspensão.

Utilizou-se meio MS-C para avaliar a(s) melhor(es) combinação(ões) de reguladores de crescimento para obtenção de células em suspensão, em experimento com concentração de auxina variável e cinetina igual a 0,0 e 2,5 µM. As fontes de auxina foram ácido Naftaleno acético (NAA) nas concentrações de 0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µM, e 2,4-D na concentração de 2,5 µM, em séries duplicadas com caseína (2 g/l) e sem caseína. O pH foi ajustado para 5,5 após a adição de todos os componentes, antes da autoclavagem. Após a inoculação dos calos em erlenmeier de 250 ml com 50 ml de meio líquido, os frascos permaneceram em agitador orbital horizontal, com aproximadamente 150 rotações por minuto, a temperatura ambiente e iluminação natural.

Três concentrações de inóculo inicial foram testadas

o período de crescimento foram realizadas de três em três dias, utilizando hematocitômetro com quatro campos de 2 μ l. A cada três dias, foi removido o meio antigo por centrifugação (100g - 5 a 10 minutos) e sucção à vácuo. Um mesmo volume de meio líquido (25ml) foi adicionado às células. A periodicidade de subculturas das células em meio líquido foi testada em erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml de meio líquido com a concentração de cerca de 5×10^4 células/ml. Periodicamente foi adicionado 30% do volume anterior do meio líquido MS-C suplementado com NAA (10,0 μ M) e Kin (2,5 μ M).

5. Metodologia de Cultura de Células para Testes de Mn in vitro

Visando a otimização das técnicas de cultura e seleção de células de cenoura na presença de um gradiente de concentração de Mn^{+2} , escolheu-se o cultivar II devido às suas ótimas características de crescimento tanto em meio de cultura sólido como em meio de cultura líquido.

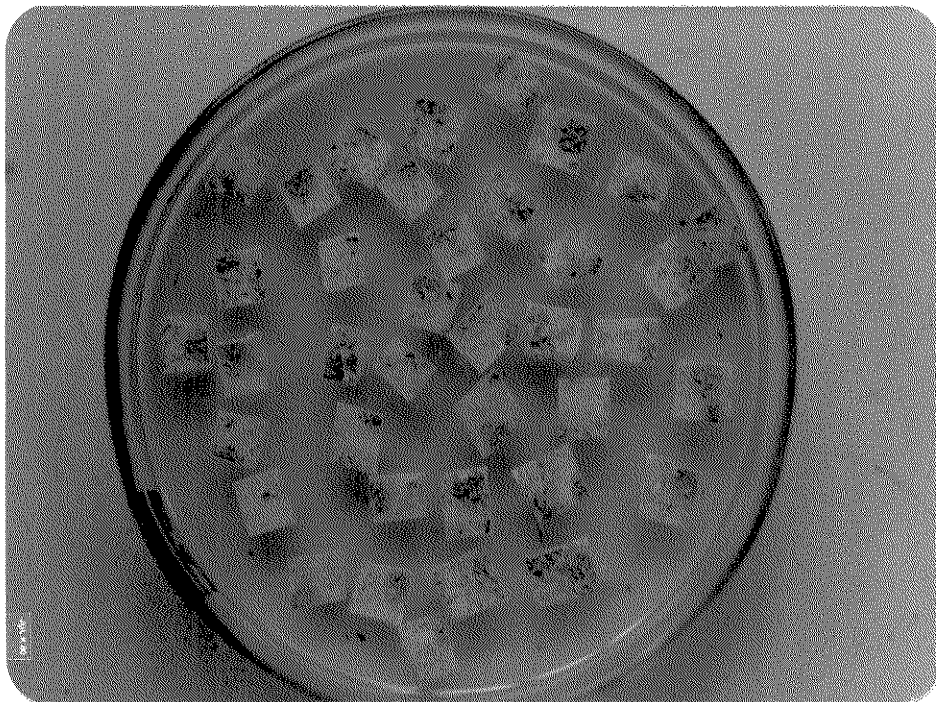
5.1. Meios Sólidos para Transferência de Células Provenientes do Meio Líquido.

Utilizou-se meio de cultura sólido MS-C em tratamentos com combinações de reguladores de crescimento para indução de calos, a partir de células em suspensão. Foi conduzido um experimento dialético (6 x 6), utilizando NAA nas concentrações de 0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 μ M e Kin nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μ M. O pH foi ajustado para 5,5 após a adição de todos os componentes, antes da autoclavagem. O experimento consistiu de 36 tratamentos com 10 repetições, em frascos quadrados de 50 ml, com 10 ml de meio de cultura. Os frascos foram vedados com

As células em suspensão (cultivar II) foram filtradas à vácuo, em filtro de porcelana (Funil Buchner) de 15 cm de diâmetro, com papel de filtro "Whatman" nº 1, para eliminar o meio líquido. Este papel de filtro, contendo uma camada superficial de células, foi cortado com tesoura, em segmentos de 5 x 5 mm (Fig. 2), em condições assépticas. Estes segmentos foram utilizados como fonte de explantes para inocular os experimentos com diferentes concentrações de Manganês.

5.2. Fontes de Manganês

Para avaliar o comportamento de células em função de duas fontes inorgânicas de Manganês (Sulfato e Cloreto), foi conduzido o experimento em meio sólido MS-C, com NAA (10,0 μ M) e Kin (2,5 μ M), utilizando-se um gradiente de concentração de Manganês de 0,1; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0; 24,0; 28,0; e 32,0 mM. A concentração de Manganês no meio Murashige e Skoog (1962) é de 0,1 mM de $MnSO_4$. O pH do meio foi ajustado para 5,0 após a adição de todos os componentes, e foi esterilizado por filtro membrana Millipore 0,45 μ m, exceto o Agar que foi autoclavado. Para o preparo de 1 litro deste meio, dissolve-se os componentes inorgânicos e orgânicos em um volume final de 500 ml com água destilada e o Agar em outra alíquota de 500 ml. Após o ajuste do pH da fração contendo o meio de cultura, procedeu-se a esterilização por membrana de Millipore 0,45 μ m à vácuo em câmara asséptica. A fração contendo o Agar foi autoclavada e misturada a quente com a fração filtrada. Após homogeneização, o meio completo foi distribuído, em câmara asséptica, nos frascos de cultura, previamente autoclavados. O inóculo de células foi obtido através de filtragem das células em suspensão (cultivar II), conforme descrito no item 5.



repetições, utilizando-se frascos quadrados de 50 ml, com 10 ml de meio de cultura sólido vedados com filme de PVC. A avaliação foi feita através do peso fresco dos calos, após 28 dias de cultivo em sala escura, temperatura de 24 - 28° C.

Os calos foram agrupados por tratamentos e utilizados para determinação das concentrações de nutrientes. Os extratos para determinação foram preparados por via úmida, com digestão nitroperclórica (Bataglia et al., 1978).

5.3. Variação do pH Inicial

Procurou-se avaliar o comportamento de células cultivadas em seis níveis de pH (4,0; 4,25; 4,5; 4,75; 5,0 e 5,5) em interação com três níveis de $MnCl_2$ (0,1; 8,0 e 16,0 mM). Utilizou-se o meio MS-C, com NAA (10,0 μM) e Kin (2,5 μM), o qual foi esterilizado através de filtro de membrana Millipore (0,45 μm), conforme descrito no item 5.2.0 inóculo foi obtido através de filtração das células em suspensão (cultivar II) sob papel de filtro conforme descrito no item 5.1. Este experimento constou de 18 tratamentos com 10 repetições, em frascos quadrados de 50 ml, com 10 ml de meio sólido. Os frascos foram vedados com filme de PVC. A avaliação foi feita através do peso fresco de calos, após 28 dias de cultivo no escuro, a temperatura de 24 - 28°C.

5.4. Meio de Murashige e Skoog Modificado

Foi testada a influência de níveis de Fósforo, Cálcio e Magnésio sobre a disponibilidade de Manganês, em meio de cultura básico de MS-C, na presença de células de cenoura. Os níveis de Fósforo, Cálcio e Magnésio foram os seguintes: nível A (P 0 125 mM

mM) e nível normal N (P 1,25 mM, Ca 3,0 mM e Mg 1,5 mM). Os níveis de $MnCl_2$ utilizados foram: 0,1; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0; 24,0; 28,0 e 32,0 mM. O pH do meio foi ajustado para 5,0 após a adição de todos os componentes, e foi esterilizado em filtro de membrana Millipore (0,45 μm), conforme descrito no item 5.2.

O inóculo foi obtido através de filtração das células em suspensão (cultivar II), com papel de filtro nº 1 conforme descrito no item 5.1. Este ensaio constou de 18 tratamentos com 10 repetições, utilizando-se frascos quadrados de 50 ml, de meio sólido MS-C, suplementado com NAA (10,0 μM) e Kin (2,5 μM). Os frascos foram vedados com filme de PVC e avaliados após 28 dias de cultivo em ambiente escuro, com temperatura entre 24 - 28° C. A avaliação foi feita através do peso fresco de calos. O meio de cultura MS-C contendo o nível A e pH ajustado para 5,0 passou a ser designado MS-Cm.

5.5. Esterilização dos Meios de Cultura

Para esterilização dos meios de cultura, utilizou-se uma autoclave horizontal modelo 39.206 Luferco (120° C, 1,0 atm de pressão, durante 20 minutos), e filtro de membrana Millipore de 0,45 μm de 47 mm de diâmetro (modelo HAWP 047 00). Duas séries de meio de cultura MS-Cm sólido, com um mesmo gradiente de concentração de Manganês, foram submetidas simultaneamente a estes dois processos de esterilização, a fim de verificar os efeitos da esterilização sobre a integridade do meio de cultura. O gradiente de concentração de $MnCl_2$ utilizado foi o seguinte: 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mM.

O inóculo foi obtido através de filtração das células em suspensão (cultivar II) conforme descrito no item 5.1. Este exp

mentado com NAA (10,0 μM) e Kin (2,5 μM). Os frascos foram vedados com filme PVC. A avaliação foi realizada através do peso fresco de calos, após 28 dias de cultivo no escuro, a temperatura de 24-28°C.

6. Diferenciação Somática

Após estabelecimento da metodologia de cultura de células para testes de Manganês in vitro, foi conduzido um experimento a fim de avaliar a diferenciação de embriões somáticos de cenoura (cultivar II).

Utilizou-se meio de cultura sólido MS-C, suplementado com 3,5 μM de 2,4-D durante 28 dias, a temperatura 24 - 28°C, no escuro, seguido por subcultura em meio sólido MS-C, desprovido de reguladores de crescimento. A avaliação de indução de embriões somáticos foi realizada após 60 dias de cultura a temperatura de 24 - 28°C em ambiente iluminado artificialmente.

7. Interação de IAA com Manganês

Um experimento dialético de 5 x 5 foi montado para avaliar o efeito de concentração de Manganês sobre a indução de calos na presença de IAA. O meio de cultura sólido utilizado foi MS-Cm, suplementado com Kin (2,5 μM).

As concentrações de IAA e Manganês adotadas foram as seguintes: 1,0; 15,0; 30,0; 45,0 e 60,0 μM de IAA e 0,1; 2,0; 4,0; 8,0 e 12,0 mM de MnCl_2 . O pH do meio foi ajustado para 5,0 e esterilizado em filtro de membrana, conforme descrito no item 5.2.

O inóculo foi obtido através de filtração das células em suspensão (cultivar II), conforme descrito no item 5.1. Este expe

me PVC e avaliados através de peso fresco de calos, após 28 dias de cultivo em ambiente escuro, a temperatura de 24 - 28° C.

8. Seleção de Clones Celulares Tolerantes ao Excesso de Mn

8.1. Reação dos Seis Cultivares ao Excesso de Manganês

Para caracterizar o padrão de crescimento de seis cultivares de cenoura, utilizou-se meio de cultura sólido MS-Cm, suplementado com NAA (10,0 µM) e Kin (2,5 µM), em um mesmo gradiente de concentração $MnCl_2$ de 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 2,0; 4,0 e 8,0 mM. O pH foi ajustado para 5,0 após a adição de todos os componentes e o meio de cultura foi esterilizado por filtro de membrana, conforme descrito no item 5.2.

O inóculo foi obtido através de filtração das células em suspensão (seis cultivares) conforme descrito no item 5.1. Nestes experimentos adotaram-se 9 tratamentos com 10 repetições utilizando-se frascos quadrados de 50 ml, com 10 ml de meio. Os frascos foram vedados com filme PVC e mantidos no escuro por 28 dias, a temperatura de 24 - 28° C. A avaliação foi feita através de peso fresco de calos.

Em seguida foram calculadas relações de crescimento (R.C.) dividindo-se o peso fresco de calos de cada cultivar pelo peso fresco de calos do tratamento que apresentou maior crescimento, considerado como 100%.

8.2. Indução e Seleção de Clones Mutantes

Utilizou-se Etil Metano Sulfonato (EMS) como mutagêni

pH 5,0 e esterilizados por filtro de membrana, conforme descrito no item 5.2. O EMS é um mutagênico de grupo de agentes alquilantes, derivado de ácido metano sulfônico.

Células em suspensão (cultivar II) foram obtidas através de filtração e tratadas durante 6 horas com EMS em agitador horizontal (150 rpm). Utilizou-se erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura para cada concentração de EMS. Cada erlenmeyer foi inoculado com cerca de 4 g de células de cultura em suspensão. Após a realização dos tratamentos, procedeu-se a lavagem (5 vezes) com meio líquido MS-C (NAA 10,0 μ M, Kin 2,5 μ M) e filtradas conforme descrito no item 5.1. Os segmentos foram inoculados em meio sólido MS-C (NAA 10,0 μ M, Kin 2,5 μ M), em um gradiente de concentração de $MnCl_2$ (0,1; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0; 24,0; 28,0 e 32,0 mM) para seleção de clones tolerantes.

O experimento constou de 45 tratamentos com 4 repetições, em frascos quadrados de 50 ml, com 10 ml de meio sólido. A avaliação foi realizada através de peso fresco dos calos, após 28 dias de cultura no escuro, à temperatura de 24 - 28° C.

Em seguida foram calculadas relações de crescimento (R.C.), dividindo-se peso fresco de calos em cada concentração de EMS pelo peso fresco de calos do tratamento sem mutagênico, dentro de cada concentração de Manganês.

Usando a mesma metodologia descrita acima, foi conduzido outro experimento com EMS nas concentrações de 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} e 10^{-9} M com duração de 12 horas.

Um terceiro experimento, utilizando 10^{-5} M EMS durante 6 horas em agitador, foi montado a partir de um inóculo conhecido de células em suspensão do cultivar II. Células e pequenos agregados foram obtidos por filtração em peneira de aço inoxidável

a contagem de células e pequenos agregados em hematocitômetro, obtendo-se $7,9 \times 10^4$ células/ml ou seja um total de $1,6 \times 10^7$ células. Foram tomadas alíquotas de 50 ml em tubo de centrifuga e o meio líquido foi eliminado por centrifugação (100 g/10 minutos) e sucção (Fig. 3). Os pellets de células foram suspensos até 50 ml com meio de cultura contendo 10^{-5} M EMS. Após incubação em agitador (70 rpm) durante 6 horas, o meio contendo mutagênico foi removido por centrifugação (100 g/10 minutos) e o pellete de célula foi lavado 3 vezes com meio fresco (MS-C, NAA 10,0 μ M, Kin 2,5 μ M). Após a última lavagem, o pellete foi suspenso em 50 ml de meio líquido e subdividido em 5 frações. Cada fração foi filtrada em funil de porcelana (6 cm de diâmetro) contendo papel de filtro "Whatman" nº 1 de 5,0 cm de diâmetro. Cada disco de papel, contendo uma camada de células tratadas com EMS, foi inoculado em placa de Petri de 10 cm de diâmetro, contendo meio sólido (MS-Cm, 2,5 μ M Kin, 10 μ M NAA) e $MnCl_2$ nas seguintes concentrações: 0,025; 0,075; 0,5; 2,0 e 8,0 mM. As placas foram mantidas no escuro, à temperatura de 24 - 28° C durante 60 dias. Os calos resultantes de cada concentração de Manganês foram transferidos para o meio sólido condicionante: MS-C suplementado com 3,5 μ M de 2,4-D. Após 15 dias de cultivo no escuro, os calos foram transferidos para meio de cultura MS-C desprovido de reguladores de crescimento (meio indutor) nos tratamentos de Manganês respectivos, visando a diferenciação de plantletes.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Esterilização Externa do Material Vegetal

Os tratamentos de esterilização externa das raízes de cenoura, apresentaram diferentes percentagens de contaminação (Tabela 1). Os tratamentos com Etanol 70% durante 10 minutos, seguidos de Qboa 30% (Trat. H), 50% (Trat. G) e 75% (Trat. D) durante 30 minutos, apresentaram a menor percentagem de contaminação (entre 0 e 2,5%). Os tratamentos com uma ou três flambagens das raízes (Trat. I e J) seguidos de Qboa a 50% durante 30 minutos, apresentaram taxa de contaminação de 6% e 5%, respectivamente. Os tratamentos utilizando Qboa ou Super Cândida sem diluição, durante 30 minutos (Trat. A e B), apresentaram percentagem de contaminação de 28 e 40%, respectivamente.

Os tratamentos com raspagem de epiderme seguidos de Qboa 30% (Trat. E) ou 50% (Trat. C), durante 30 minutos, apresentaram respectivamente 12 e 8% de contaminação. O tratamento com raspagem da epiderme seguido de Etanol 70% (Trat. F), durante 10 minutos e Qboa a 30% durante 30 minutos, apresentou 30% de contaminação. Era esperado menor incidência de contaminação neste tratamento. Provavelmente as raízes utilizadas apresentavam-se com contaminação vascular, não sendo portanto atingidas pelo tratamento de esterilização externa.

Notou-se diferenças na proliferação de calos provenientes dos explantes obtidos de diferentes tratamentos de esterilização, após 18 dias de cultivo em meio sólido MS-C, suplementado com Kin (1 μ M) e 2,4-D (5 μ M).

TABELA 1 - Tratamentos de esterilização externa de raízes de cenoura e percentagem de contaminação após 3 dias de incubação no escuro, em meio sólido.

TRATAMENTO	CONTAMINAÇÃO (%)
A (Qboa conc./30 min)	28,0
B (Cândida conc./30 min)	40,0
C (Raspar-Qboa 50%/30 min)	8,0
D (Etanol 70%/10min - Qboa 75%/30min)	2,5
E (Raspar-Etanol 70%/10 min-Qboa 30%/30 min)	30,0
F (Raspar - Qboa 30%/30. min)	12,0
G (Etanol 70%/10 min - Qboa 50%/30 min)	0,0
H (Etanol 70%/10 min - Qboa 30%/30 min)	1,0
I (Flambar 1 x Qboa 50%/30 min)	6,0
J (Flambar 3 x - Qboa 50%/30 min)	5,0

tratamentos com Etanol 70% e com flambagem (Trat. D, G, H, I e J). Nos tratamentos com raspagens, antes da imersão em solução esterilizante, houve variação dos índices de contaminação, mas considerando o crescimento posterior dos explantes derivados das raízes tratadas, o tratamento C mostrou-se superior aos tratamentos E e F.

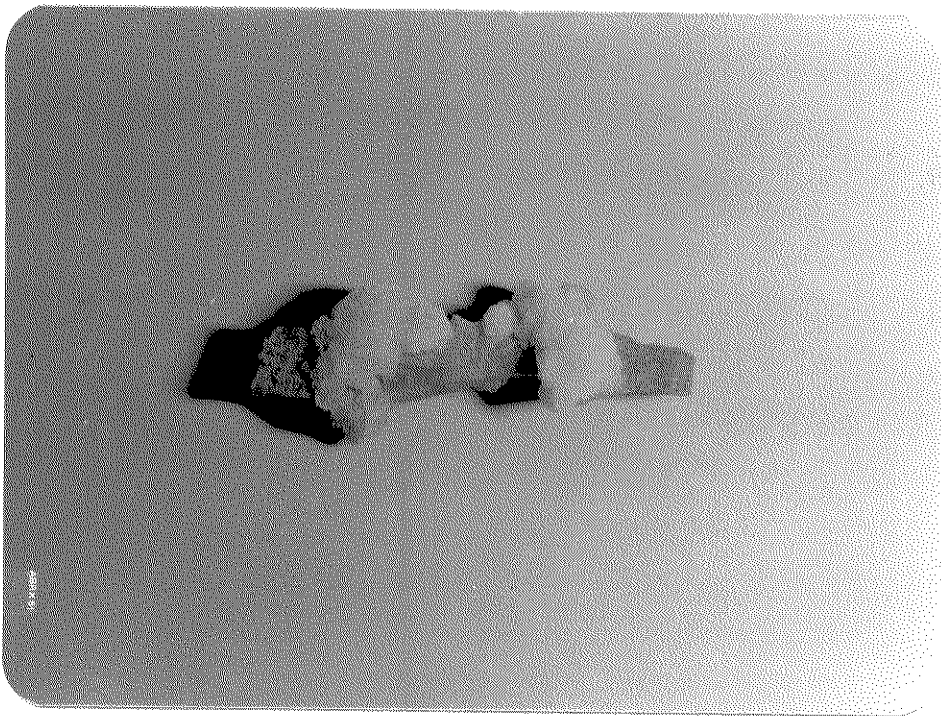
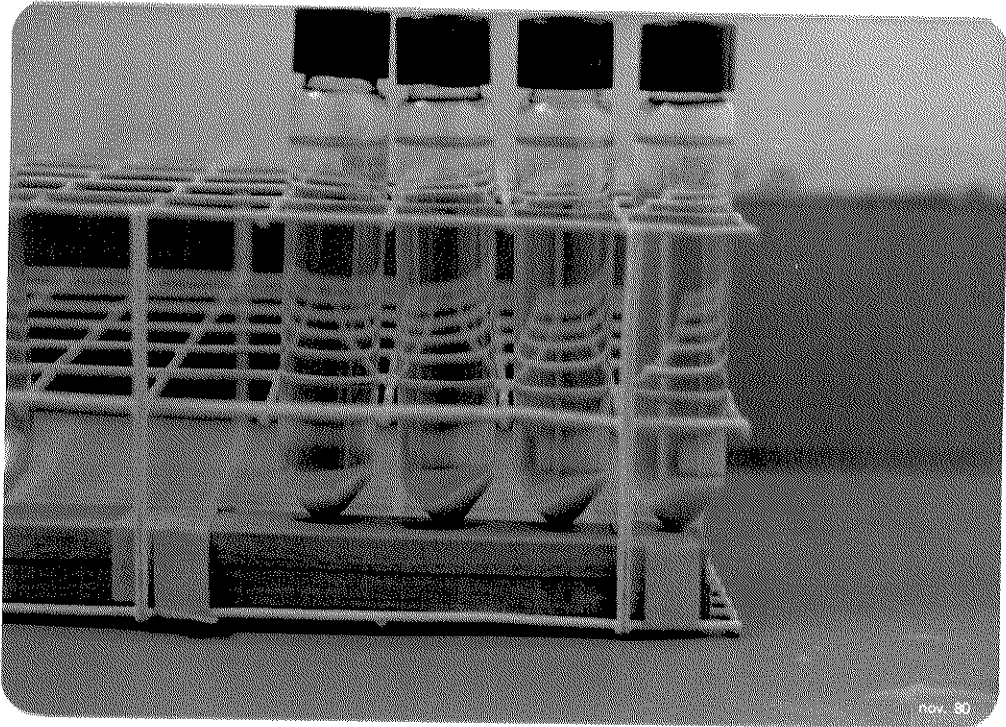
Portanto, considerando-se os resultados de contaminação e da proliferação de calos, adotou-se como método de esterilização das raízes o tratamento C, que consistiu de raspar a epiderme, seguido de imersão em solução de 2,6% de Hipoclorito de Sódio (Qboa a 50%), durante 30 minutos.

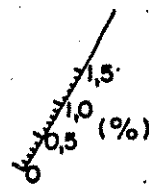
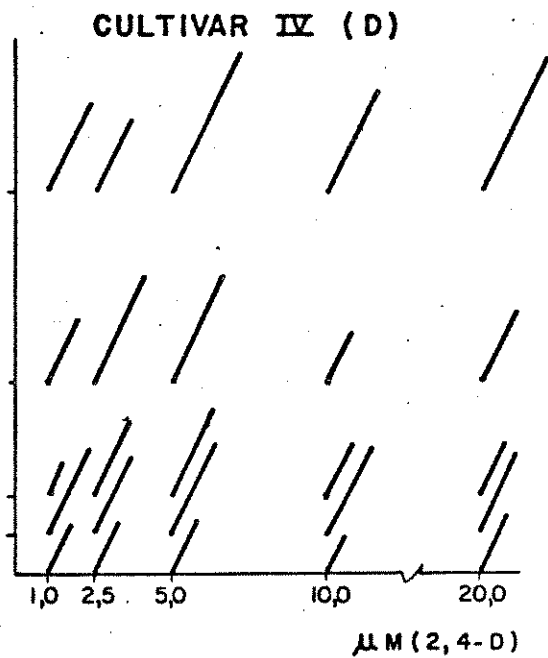
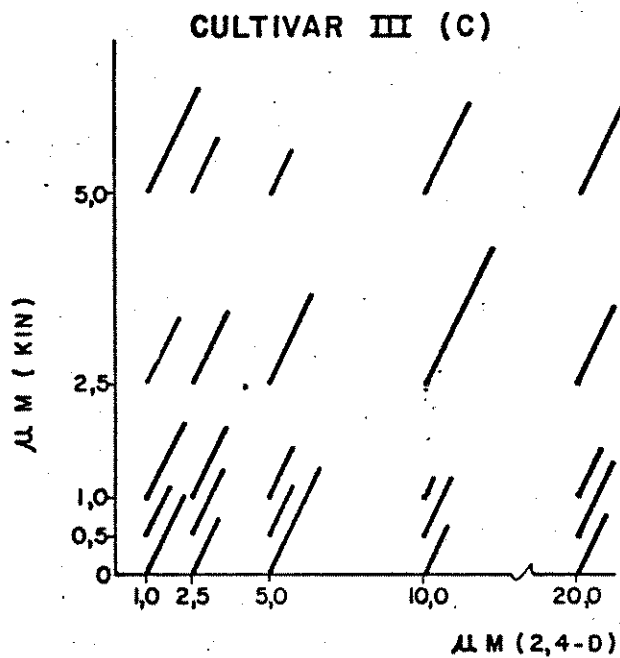
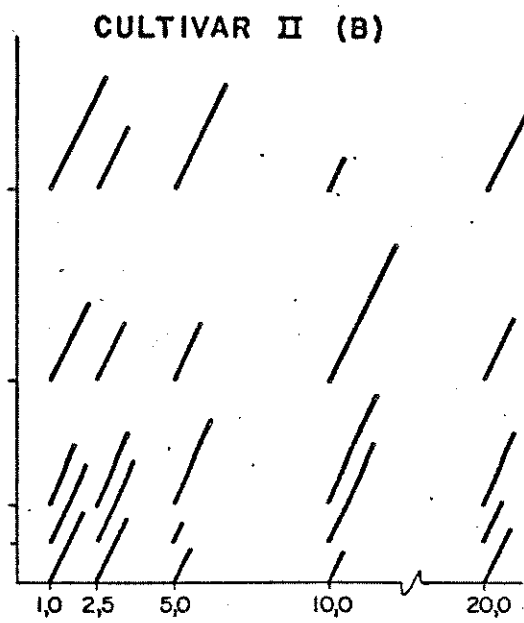
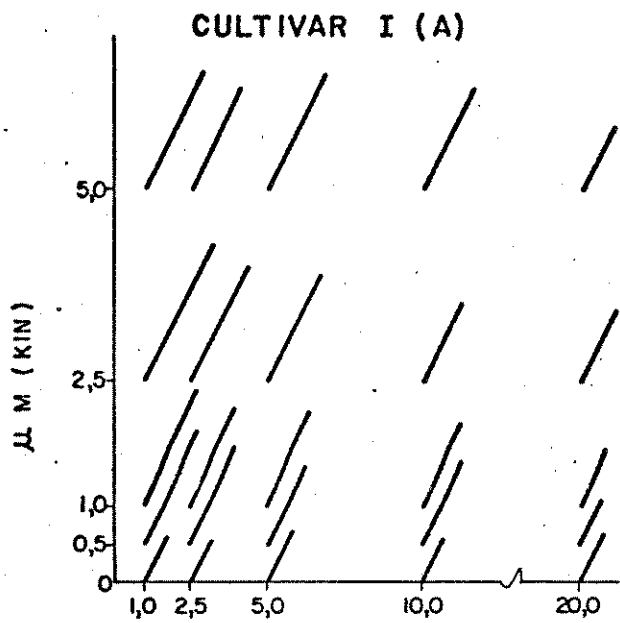
2. Região de Maior Proliferação de Calos

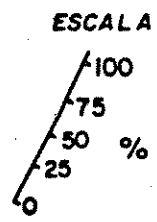
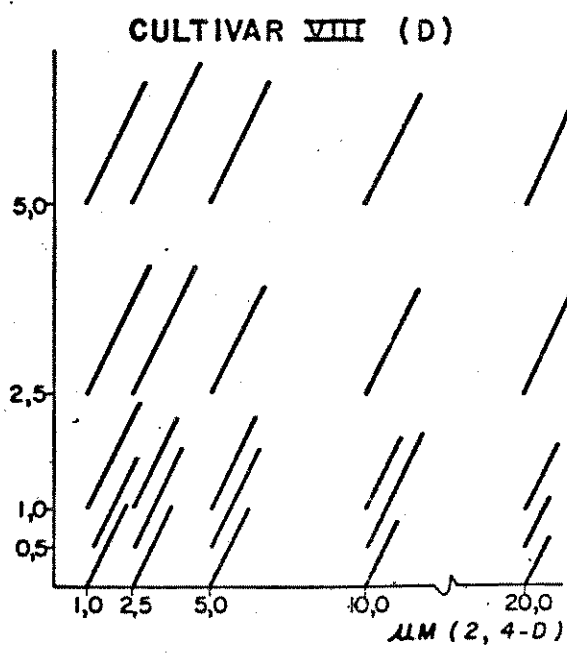
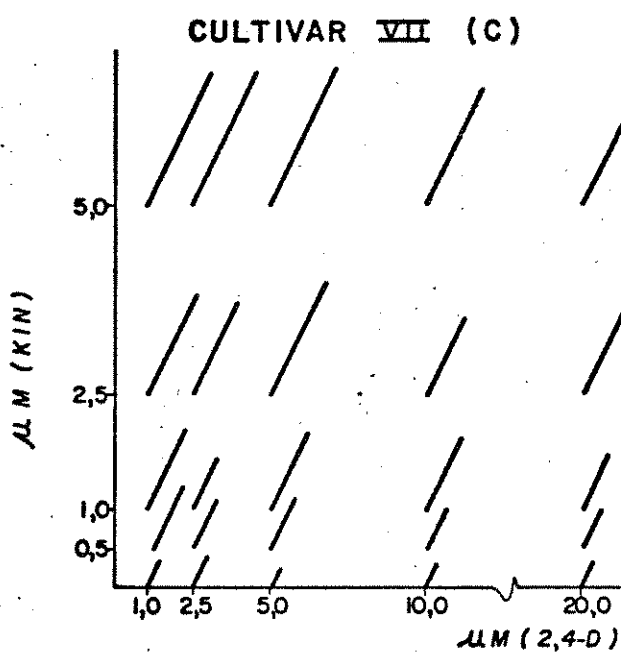
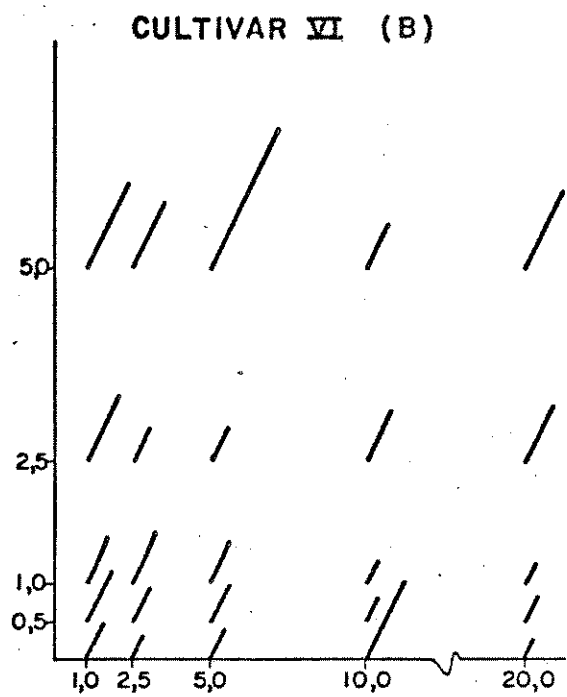
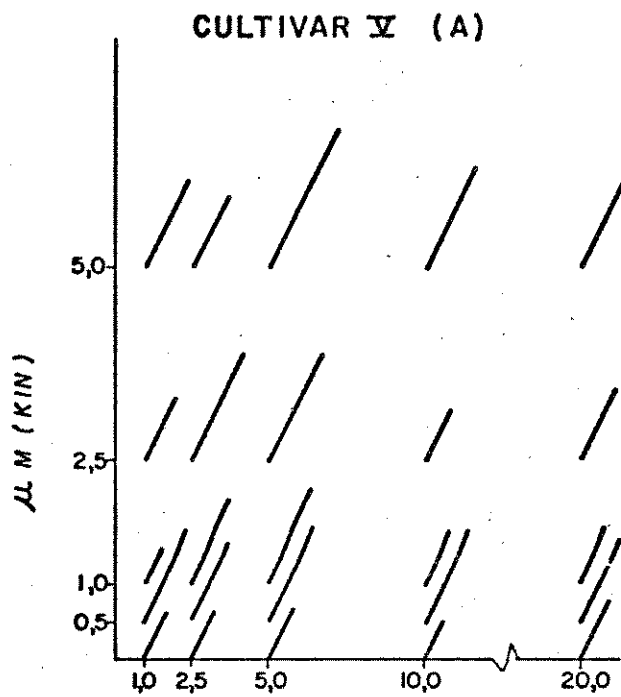
As seções transversais de discos de raízes de cenoura (Fig. 4) desenvolvidas em meio sólido MS-C, suplementada com Kin (1 μ M) e 2,4-D (5 μ M), após 25 dias de cultivo, demonstraram que a região do floema secundário era o tecido que apresentava maior proliferação de calos. Esta observação é idêntica aos resultados discutidos nos trabalhos originais com raiz de cenoura (Steward et al., 1958 e Steward et al., 1964). Baseando-se nestas observações, todos os explantes foram obtidos da região do floema secundário de discos transversais de raízes, a fim de conseguir melhor indução de calos e uniformidade nas repetições.

3. Meios de Cultura Sólidos para Indução de Calos

Os resultados de indução de calos dos experimentos dialéticos de 5 x 5 (2,4-D x Kin) utilizando como explantes cilindros da região do floema secundário, foram avaliados através de índice de crescimento (Fig. 5 e 6). Estes resultados mostraram a







fonte de auxina (2,4-D) para a indução de calos a partir de explantes iniciais nos oito cultivares de cenoura estudados.

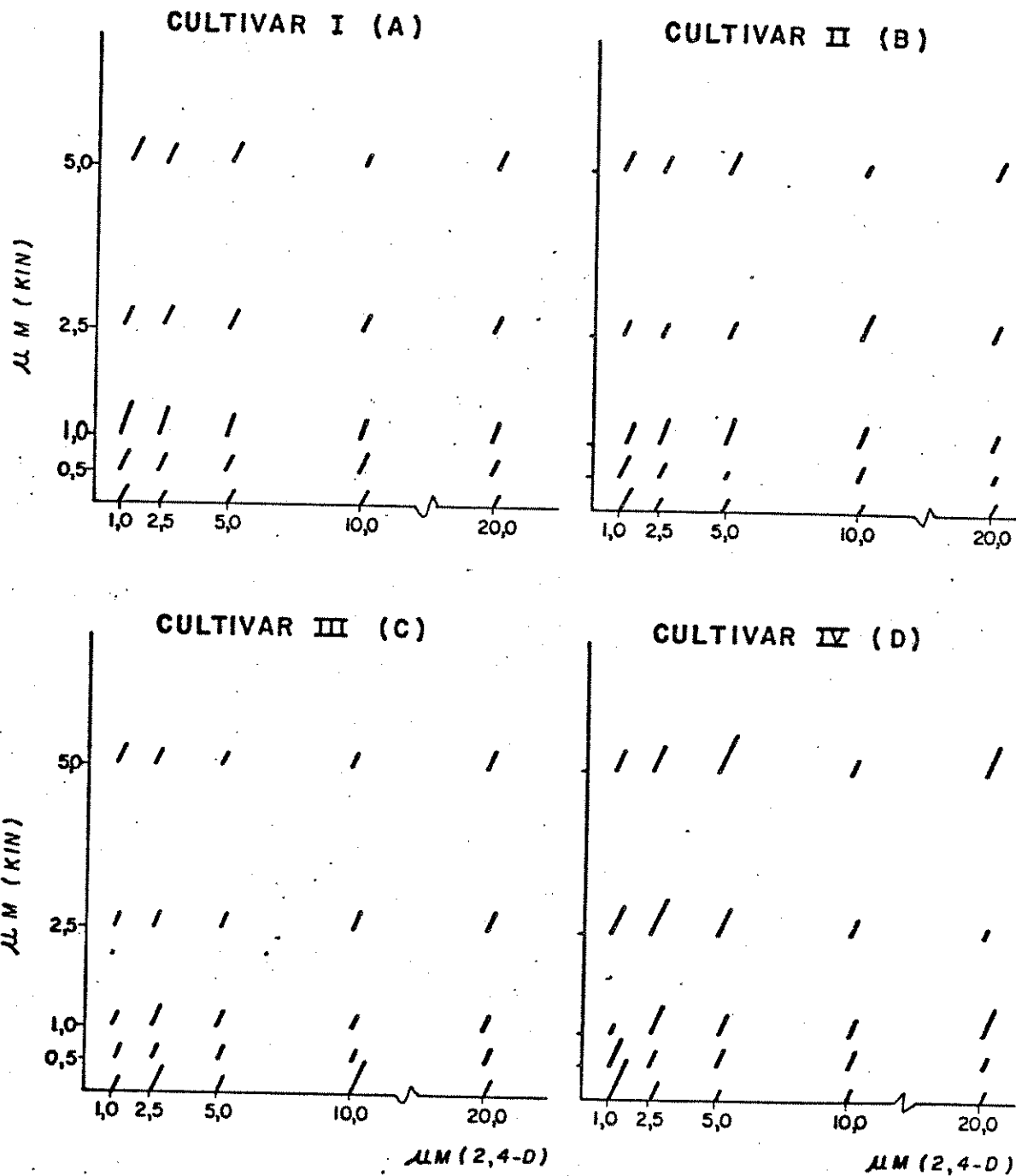
Em cinco cultivares (IV, V, VI, VII e VIII) a concentração ótima de Kin foi de 5,0 μM e nos demais de 2,5 μM (I, II e III). Encontrou-se um ótimo crescimento de calos utilizando-se uma combinação de 2,4-D (5,0 μM) e Kin (5,0 μM) para os cultivares IV, V e VII. Para os cultivares II e III a melhor combinação foi 2,4-D (10,0 μM) e Kin (2,5 μM). Para o cultivar I o melhor crescimento foi obtido com 2,4-D (1,0 μM) e Kin (2,5 μM), enquanto que o cultivar VI foi 2,4-D (1,0 μM) e Kin (5,0 μM). Finalmente, para o cultivar VIII, a melhor combinação foi 2,4-D (2,5 μM) e Kin (5,0 μM).

Estes mesmos experimentos dialélicos de 5 x 5 (2,4-D x Kin), avaliados através de peso fresco de calos (Fig. 7 e 8), confirmaram a necessidade da adição de citocinina (Kin) em interação com auxina (2,4-D) para indução de calos em explantes de sete cultivares. Apenas o cultivar III apresentou peso fresco de calos ligeiramente maior na ausência de Kin.

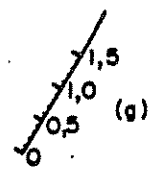
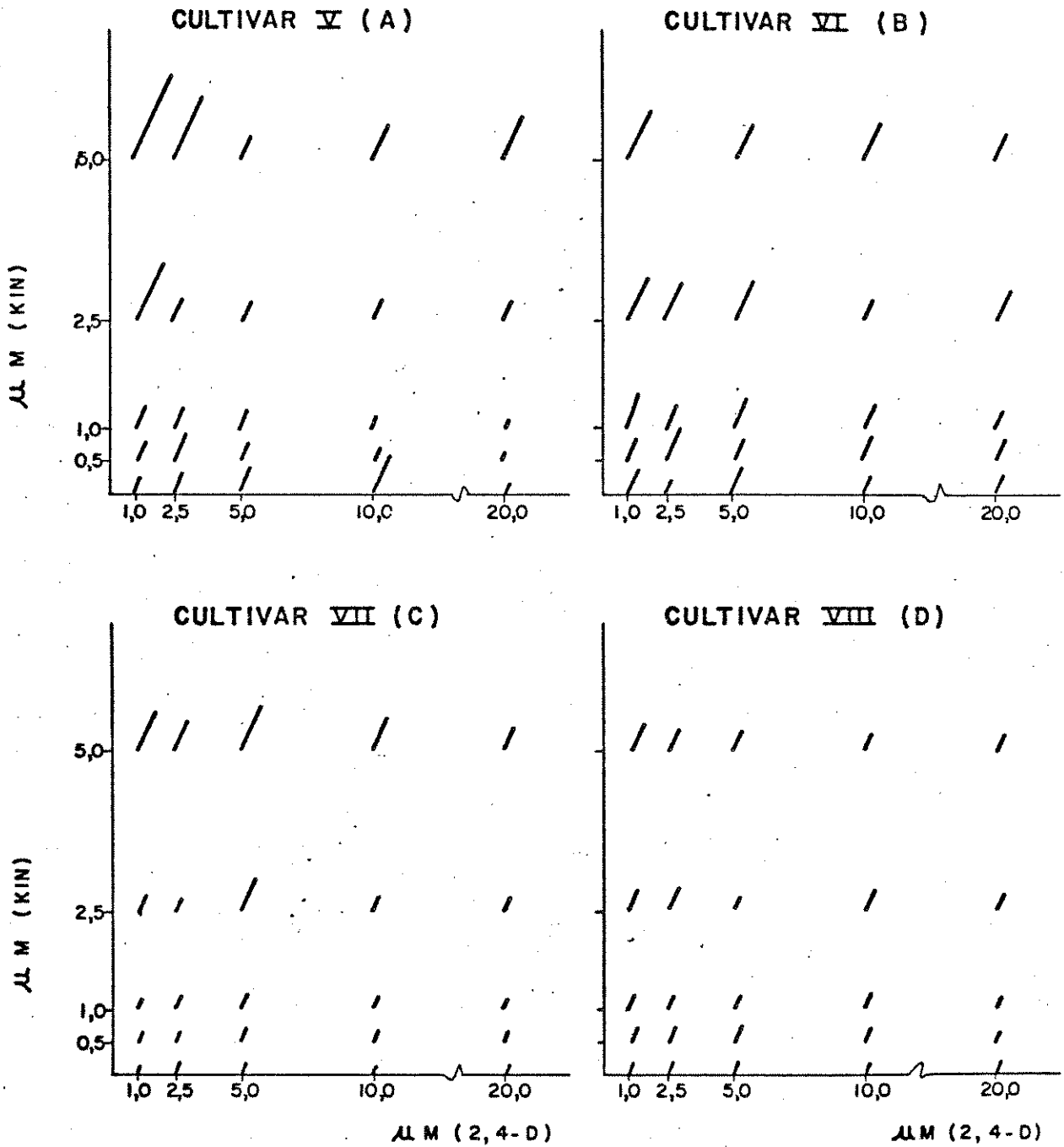
Em cinco cultivares (IV, V, VI, VII e VIII) encontrou-se uma concentração ótima de Kin de 5,0 μM . Em dois outros cultivares (I e II) foi de 2,5 μM e para o cultivar III ausência deste fitoregulador.

4. Cultura Líquida para Células em Suspensão

Utilizando-se meio salino MS-C observou-se que a presença de cinetina (2,5 μM) era essencial para multiplicação em meio líquido, em presença da auxina (2,4-D ou NAA). A presença de hidrolisado de caseína (2 g/l) não melhorou o crescimento de células em suspensão na presença de 2,4-D (5,0 μM). Os tratamentos contendo



ESCALA
 1,5
 1,0
 0,5 (g)
 0

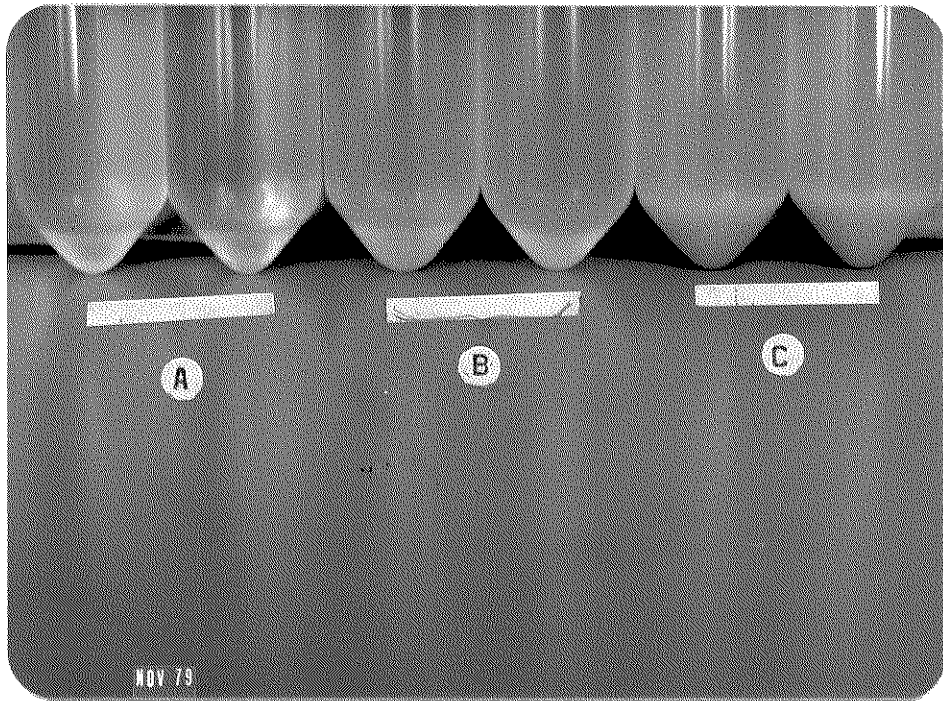


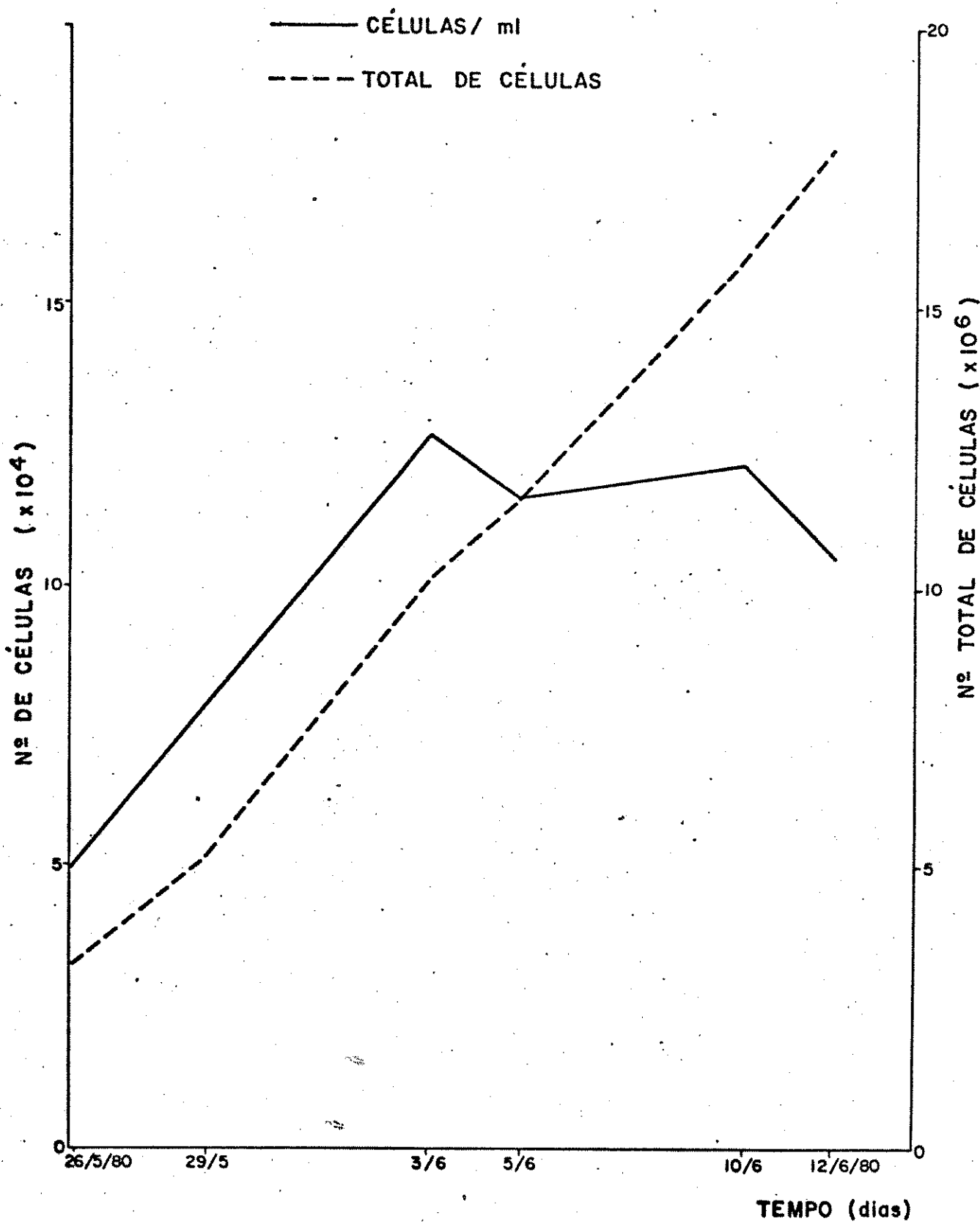
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS DEL CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CONICET)

para manutenção das culturas líquidas devido a possíveis anomalias cromossômicas atribuídas ao 2,4-D em culturas prolongadas (Yeoman e Street, 1977; Sunderland, 1977).

Para verificar a influência do inóculo inicial de células no estabelecimento de cultura líquida, foram utilizadas três concentrações iniciais de células: 10^3 , 10^4 e 10^5 células/ml. O meio líquido foi substituído por centrifugação e sucção a cada três dias. Após trinta dias de cultivo, verificou-se que a concentração inicial do inóculo devia ser entre 10^4 e 10^5 células/ml para garantir a viabilidade da cultura líquida (Fig. 9 B e C).

Em um outro experimento, procurou-se verificar a possibilidade de adicionar um certo volume de meio fresco (30% do volume anterior), para a manutenção em longos períodos de células em suspensão. A partir de um inóculo inicial de 5×10^4 células/ml, num volume total de 50 ml, notou-se que a multiplicação das células foi positiva e linear. Isto pode ser demonstrado pela linha tracejada de Fig. 10, representando o número total de células. Este resultado permitiu adotar a técnica de adição periódica de 30% de meio fresco nos frascos em cultura líquida, e assim evitar as operações de centrifugação e aspiração do meio líquido antigo. Neste experimento, verificou-se ainda que a concentração máxima de células de cenoura (cultivar II) no meio líquido adotado foi de $1,25 \times 10^5$ células/ml, ou seja, esta é a concentração máxima que este meio é capaz de suportar (Fig. 10). A adição periódica de meio fresco é fundamental para manutenção da viabilidade das células em suspensão. Quando o meio fresco foi adicionado em intervalos de cinco dias, houve decréscimo do número de células/ml e quando o intervalo foi de 2 - 3 dias houve manutenção da concentração máxima (Fig. 10).



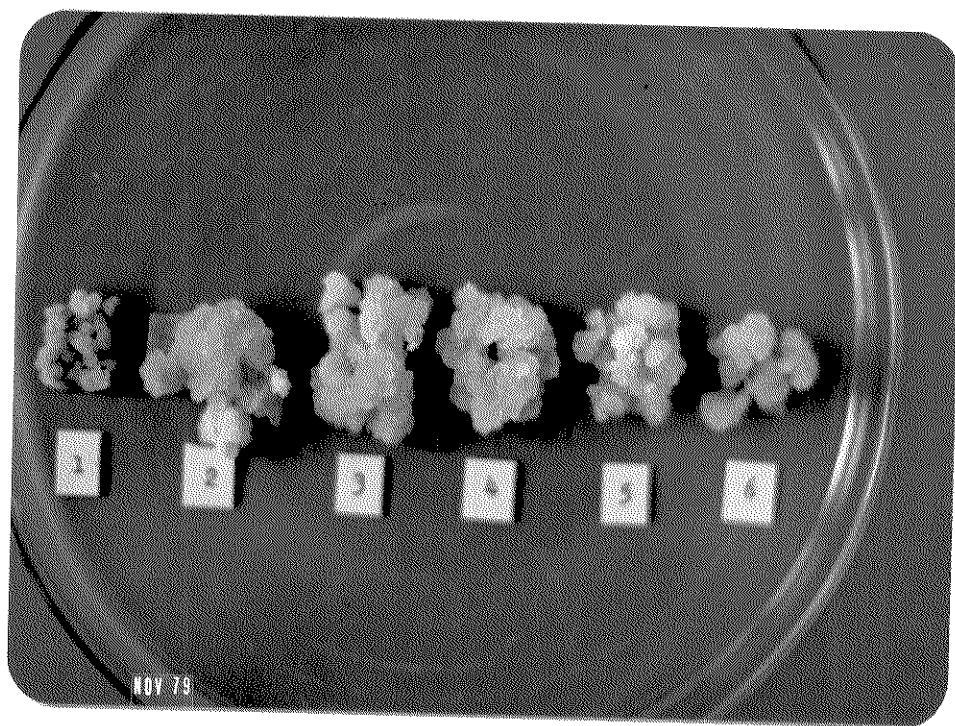


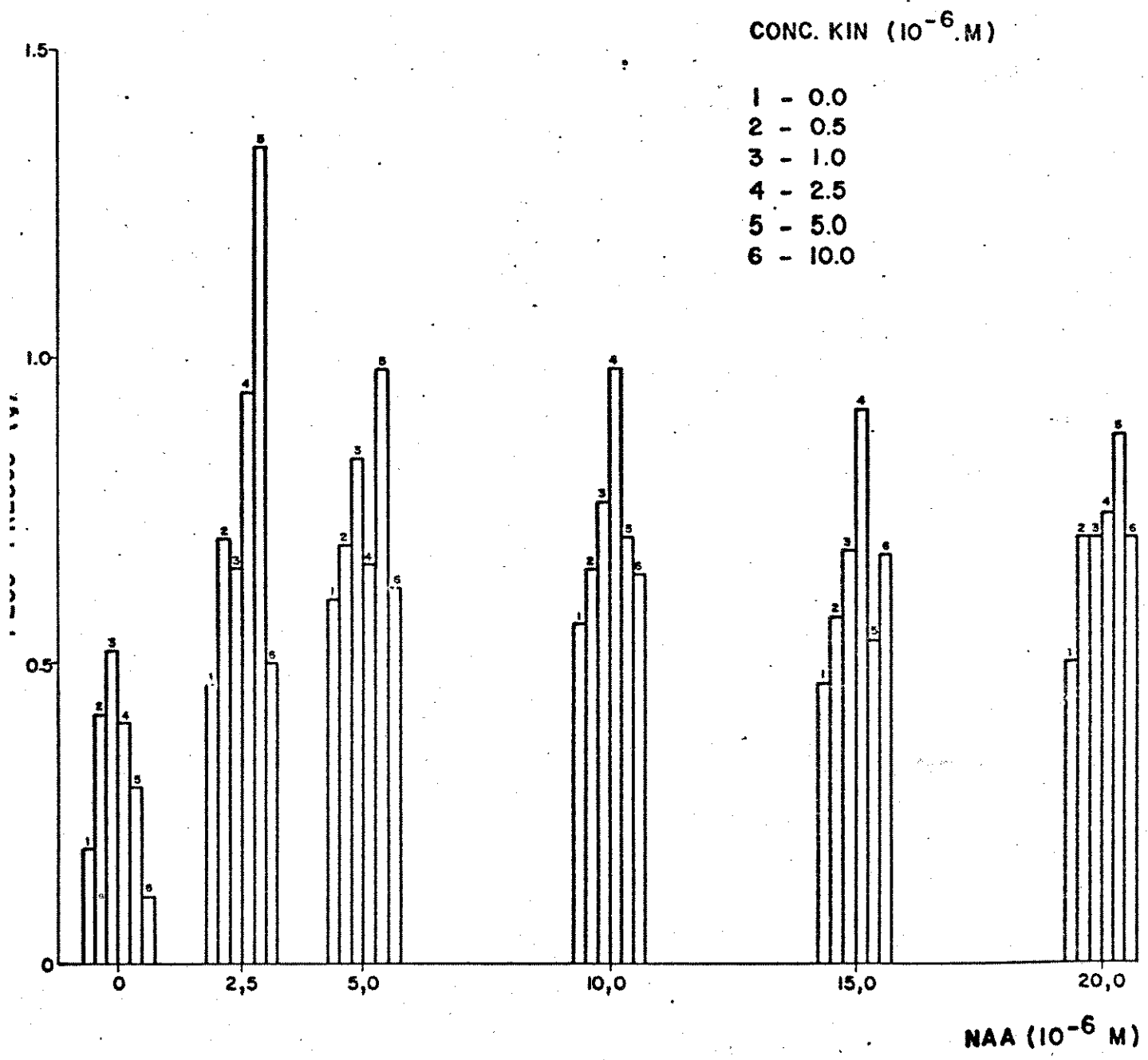
5.1. Meios Sólidos para Transferência de Células Provenientes de Meio Líquido

O efeito da concentração ótima de NAA para proliferação de calos a partir de células provenientes de meio líquido foi inicialmente testada (Fig. 11). Não houve diferença acentuada nos pesos frescos de calos quando se utilizou NAA na faixa de concentração de 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 μM (Fig. 11, 2 a 5). Estes tratamentos foram ligeiramente superiores a adição de 2,5 μM , 2,4-D (Fig. 11, 6). Devido as restrições ao emprego de 2,4-D em culturas sólidas por períodos prolongados (Yeoman e Street, 1977; Sunderland, 1977), optou-se pela suplementação com NAA para crescimento de calos na presença de gradiente de concentração de Manganês, a partir de um inóculo inicial padronizado de células em suspensão.

Através dos resultados de avaliação de peso fresco de calos do experimento dialético de 6 x 6 (Fig. 12), notou-se a necessidade da presença de citocinina (Kin) além de auxina (NAA) para indução de calos a partir de células em suspensão. A combinação Kin/NAA (5,0/2,5) apresentou a maior proliferação de calos, com peso fresco médio de 1,33 g/calos. As combinações (Kin/NAA) 2,5/2,5; 5,0/5,0; 2,5/10,0; 2,5/15,0 e 5,0/20,0 apresentaram aproximadamente os mesmos pesos frescos de calos, ou seja, em torno de 0,93 g/calos. A concentração de Kin (10,0 μM) foi inibitória para a formação de calos, uma vez que a presença deste regulador nesta concentração apresentou resultados de crescimento semelhante a sua ausência.

A combinação Kin/NAA (2,5/10,0 μM) foi usada no meio básico de manutenção de calos em cultura bem como em todos os expe





selecionada considerando-se o aspecto dos tecidos formados (estruturados e friáveis), bem como por se tratar de níveis que permitiu o crescimento de todos os cultivares em estudo.

5.2. Fontes de Manganês

A análise estatística da proliferação de calos após 28 dias de cultivo em meio MS-C (NAA 10,0 μ M e Kin 2,5 μ M), em função de duas fontes inorgânicas de Manganês (Sulfato e Cloreto, Tabela 2), revelou diferença entre concentrações ($F = 51,39^{**}$) e fontes de Manganês ($F = 15,76^{**}$).

O aumento da concentração de Manganês no meio de cultura, determinou uma diminuição progressiva do peso fresco de calos (independente da fonte sulfato ou cloreto), indicando uma inibição de crescimento diretamente proporcional ao gradiente de concentração de Manganês utilizado (Fig. 13). A influência destas duas fontes de Manganês quanto a inibição de crescimento de calos, pode ser facilmente comparada pela análise da Fig. 14.

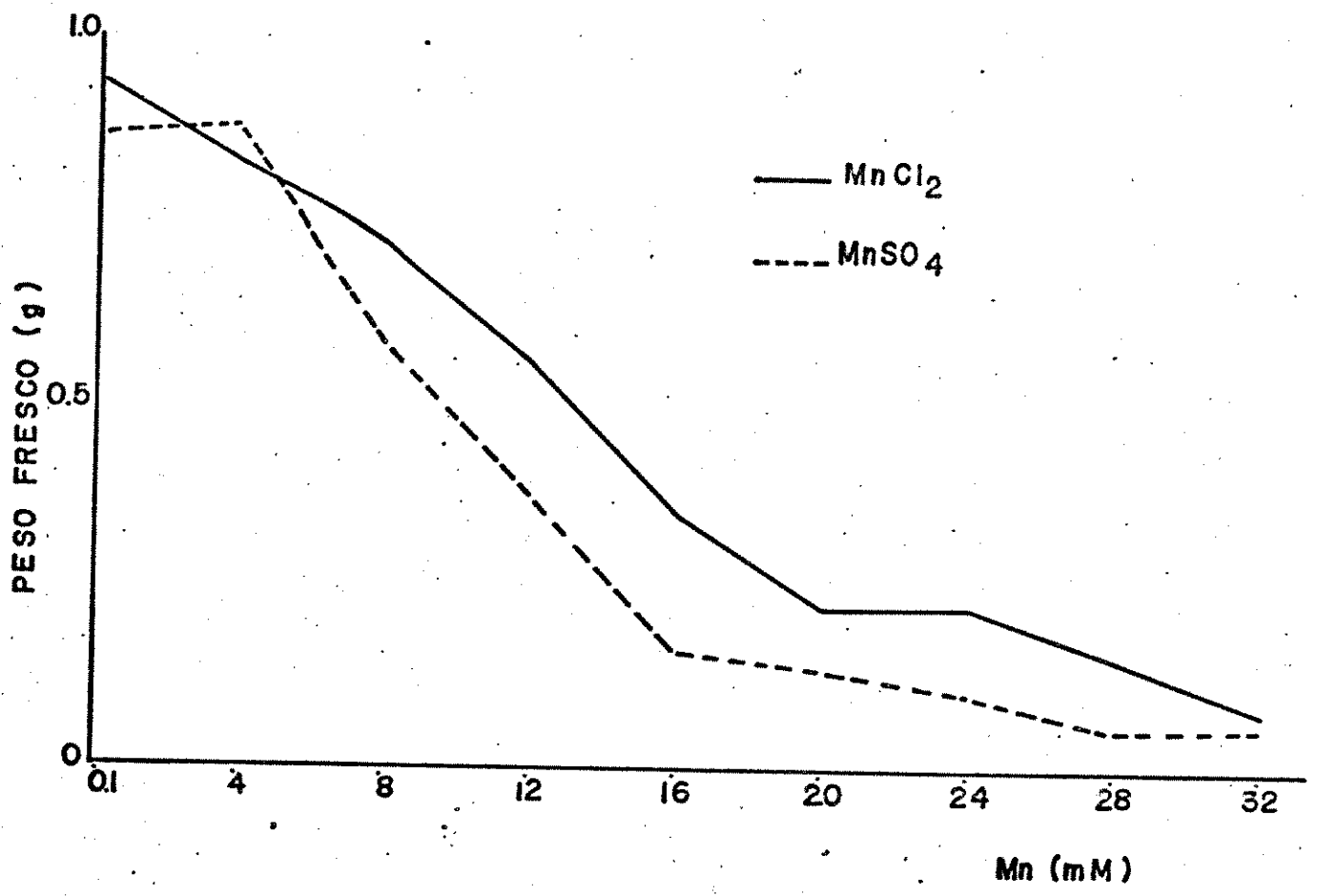
Observou-se que a fonte $MnCl_2$ permitiu um crescimento de calos cerca de 30% maior do que a fonte $MnSO_4$ na faixa de concentração estudada (Tabela 2). Escolhendo-se arbitrariamente o valor de 200 mg de peso fresco de calos nota-se que este crescimento foi obtido com 16 mM $MnSO_4$ e 24 mM de $MnCl_2$ (Tabela 2, fig. 13).

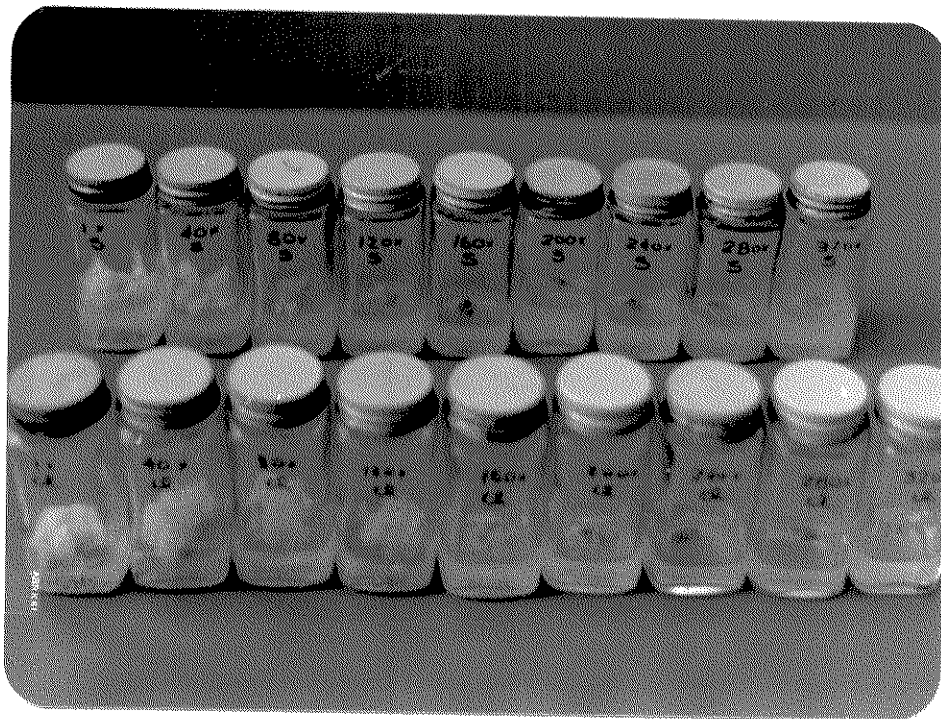
A análise quantitativa de nutrientes, demonstrou ser maior a absorção de Mn^{+2} em presença da fonte $MnSO_4$ (Fig. 15 e 16). Esta maior absorção de Manganês na presença de $MnSO_4$ foi verificada em tecidos dos dois cultivares analisados: cultivar II (Fig. 15) e cultivar IV (Fig. 16).

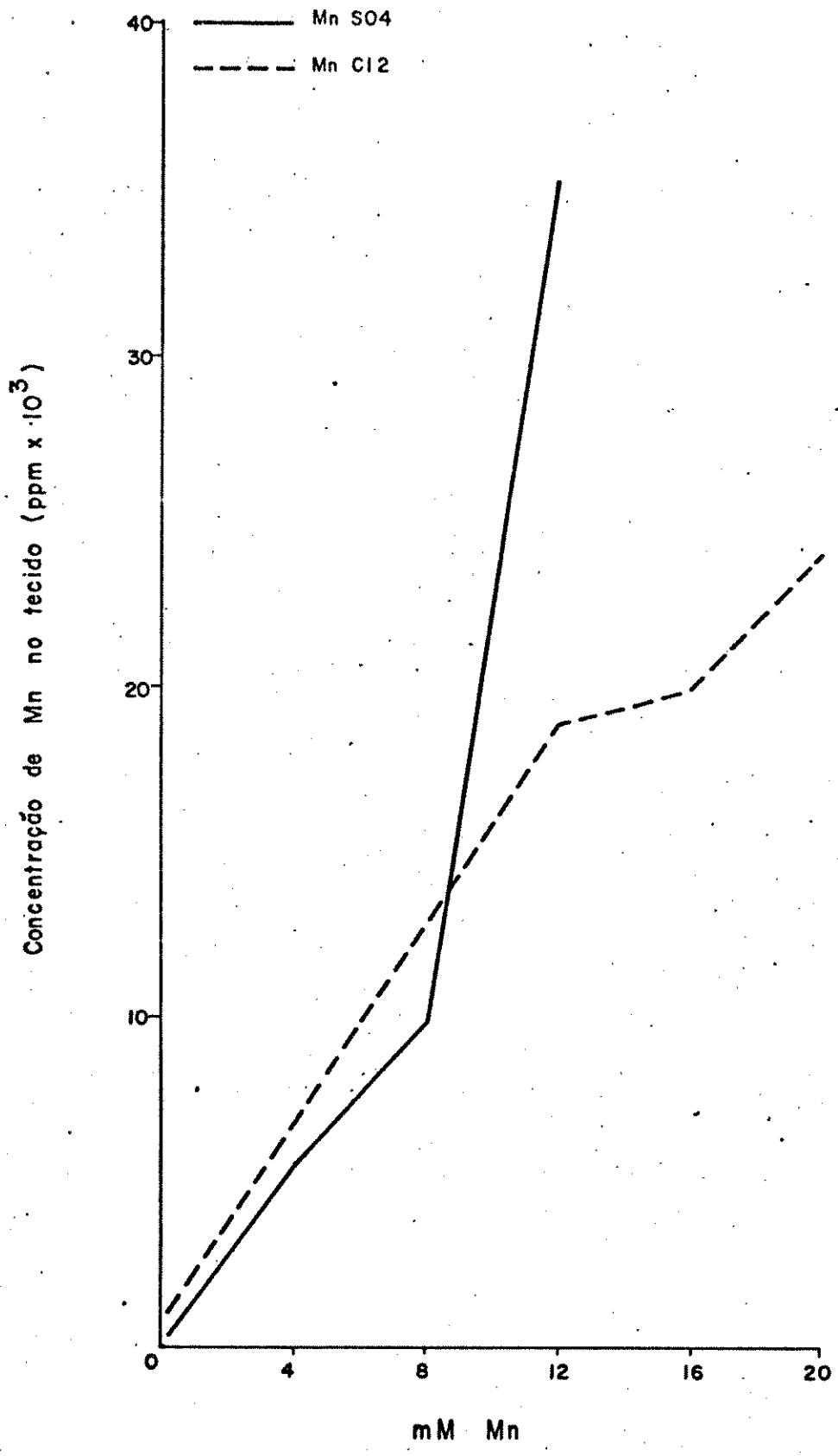
Tem sido constatado na literatura que existe uma absorção preferencial pelo ion de menor valência em sais que contêm ânions e cátions de valências diferentes. Por exemplo, utilizando-se

TABELA 2 - Comparação de duas fontes de Manganês, Sulfato e Cloreto, na faixa de concentração de 0,1 a 32,0 mM. Valores em peso fresco de calos de cenoura (Cultivar II), após 28 dias em cultura.

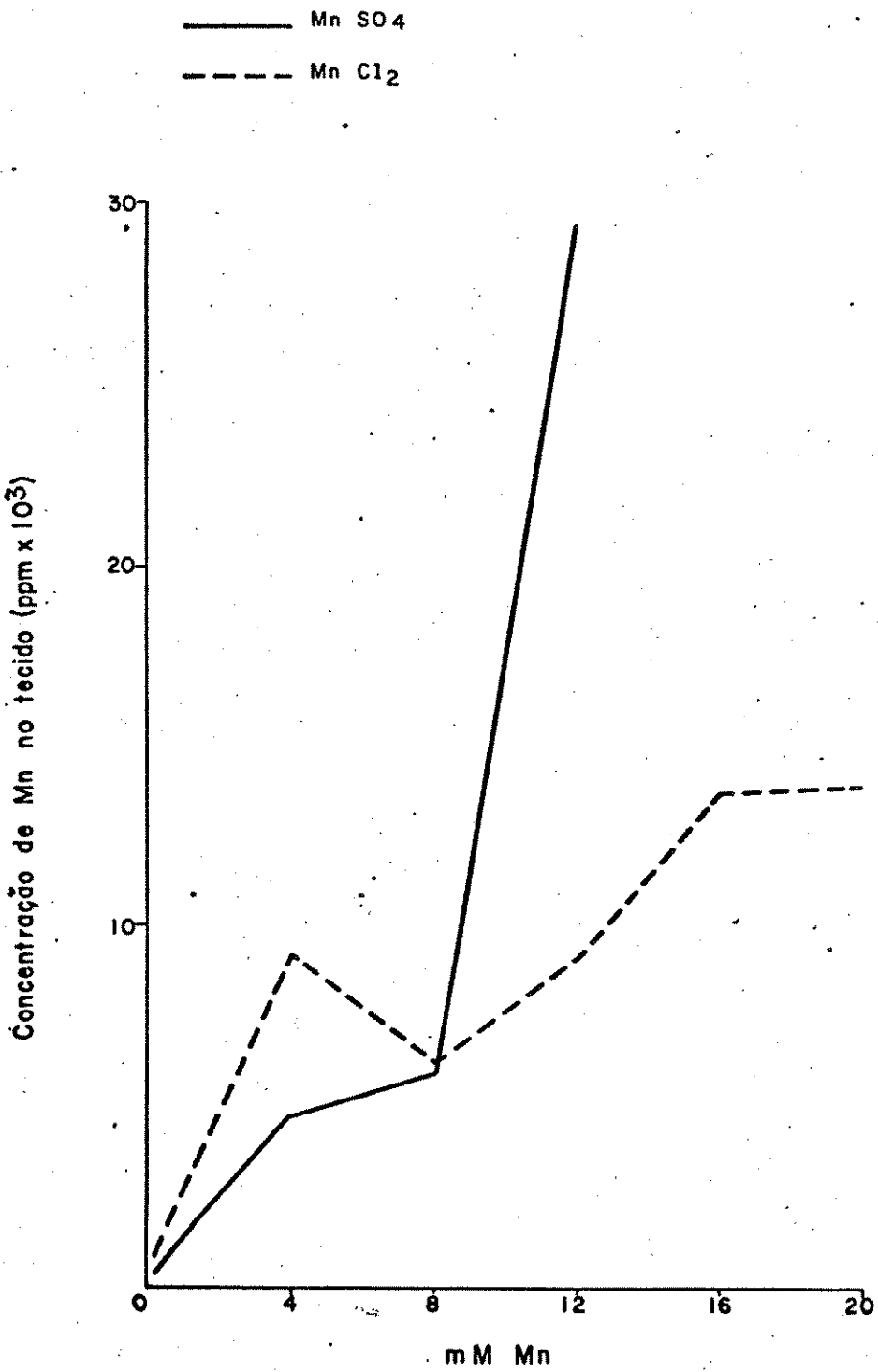
Conc. Mn (mM)	MnSO ₄ (g)	MnCl ₂ (g)	MnSO ₄ /MnCl ₂ (%)
0,1	0,8450	0,9275	91
4,0	0,8642	0,9275	106
8,0	0,5474	0,7149	76
12,0	0,3734	0,5556	67
16,0	0,1607	0,3492	46
20,0	0,1390	0,2224	62
24,0	0,1551	0,2245	69
28,0	0,0604	0,1551	39
32,0	0,0653	0,0854	76
CV%			28,30







Resumo: Este trabalho apresenta os resultados obtidos na determinação da concentração de Mn no tecido em função da concentração de Mn em solução para dois sais de manganês, MnSO4 e MnCl2. Os resultados mostram que a concentração de Mn no tecido aumenta com a concentração de Mn em solução, sendo que para MnSO4 o aumento é muito mais acentuado a partir de 8 mM Mn em solução.



uma alteração no pH do suco celular, o qual é compensado por variações no teor de ácidos orgânicos. Quando se fornece KCl, tanto o K^+ como o Cl^- são absorvidos igualmente, sem variações do teor de ácidos orgânicos (Hiatt, 1967).

Este fenômeno de absorção preferencial de ions parece explicar os resultados obtidos com as fontes de $MnCl_2$ e $MnSO_4$. Quando se adotou a fonte $MnCl_2$, deve ter ocorrido uma absorção preferencial de Cl^- em detrimento do Mn^{++} . No caso da fonte $MnSO_4$, provavelmente não houve absorção preferencial do cátion ou do ânion. Em consequência disto, os tecidos submetidos a um gradiente de concentração de Manganês com a fonte $MnSO_4$ deveriam apresentar maiores teores deste elemento em relação a fonte $MnCl_2$. A maior inibição de crescimento em todos os níveis de concentração utilizado (Tabela 2) favoreceu esta hipótese. A presença de teores mais elevados de Manganês a partir de concentração de 12,0 mM (Fig. 15 e 16; Tabelas 3 e 4), nos tecidos cultivados na presença de $MnSO_4$ também sugerem o mecanismo acima proposto.

As análises quantitativas de alguns elementos nos tecidos do cultivar II (Tabela 3), na presença de $MnSO_4$, não mostraram variações nos teores de Cálcio, Magnésio e Potássio. Fósforo e Zinco apresentaram teores muito semelhantes em toda a faixa de concentração de Manganês, exceto no nível de 12,0 mM; enquanto que o Manganês, Cobre e Ferro mostraram teores mais elevados com o aumento da concentração externa de $MnSO_4$. Os tecidos do cultivar IV (Tabela 4) apresentaram o mesmo comportamento do cultivar II, para o Cálcio, Magnésio, Fósforo, Manganês, Cobre e Zinco. O Potássio e o Ferro diminuíram com o aumento da concentração externa de $MnSO_4$.

Utilizando-se a fonte $MnCl_2$ para o cultivar II, (Tabe

TABELA 3 - Concentração de nutrientes em calos de cenoura (cultivar II) na presença de duas fontes de Manganês (Sulfato e Cloreto). Dados expressos em ppm.

Mn (mM)	MnSO ₄								
	Ca x10 ³	Mg x10 ³	P x10 ³	K x10 ⁴	Mn	Cu	Zn	Fe	Mn/Fe
0,1	5,6	2,0	5,1	2,66	231	3,99	199	310	0,75
4,0	3,9	1,3	4,7	2,90	5456	4,64	174	261	20,89
8,0	4,2	1,5	5,8	3,79	9839	9,08	204	340	28,89
12,0	5,4	2,2	10,9	2,95	35140	20,90	400	688	51,05
16,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Mn (mM)	MnCl ₂								
	Ca x10 ³	Mg x10 ³	P x10 ³	K x10 ⁴	Mn	Cu	Zn	Fe	Mn/Fe
0,1	8,5	2,9	8,5	5,98	956	13,24	557	569	1,68
4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,0	5,8	1,9	11,9	3,73	18899	10,94	363	766	24,68
16,0	4,5	1,7	9,8	5,75	19837	17,25	449	791	25,09
20,0	4,6	1,8	11,5	5,70	24033	26,93	497	841	28,57

TABELA 4 - Concentração de nutrientes em calos de cenoura (cultivar IV) na presença de duas fontes de Manganês (Sulfato e Cloreto). Dados expressos em ppm.

Mn (mM)	MnSO ₄								
	Ca x10 ³	Mg x10 ³	P x10 ³	K x10 ⁴	Mn	Cu	Zn	Fe	Mn/Fe
0,1	5,4	1,8	3,9	3,5	415	3,61	238	303	1,37
4,0	4,6	1,8	5,4	4,7	4658	4,73	201	377	12,37
8,0	3,2	1,2	5,3	3,1	5884	6,13	159	276	21,33
12,0	3,8	1,4	10,5	1,8	29373	26,87	448	105	279,48
16,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Mn (mM)	MnCl ₂								
	Ca x10 ³	Mg x10 ³	P x10 ³	K x10 ⁴	Mn	Cu	Zn	Fe	Mn/Fe
0,1	7,2	2,4	2,1	5,0	806	5,04	277	344	2,34
4,0	5,0	1,9	5,4	5,3	9072	4,54	287	375	24,16
8,0	4,2	1,4	4,5	3,9	6170	5,40	462	267	23,12
12,0	3,3	1,2	6,6	4,0	9098	9,10	210	345	26,36
16,0	2,8	1,0	6,0	2,6	13655	8,40	347	362	37,68
20,0	2,4	0,8	5,5	1,0	13861	13,86	416	501	27,67

neceram iguais. Manganês, Cobre e Ferro aumentaram. Os tecidos do cultivar IV (Tabela 4) mostraram o mesmo comportamento para com os teores de Cálcio, Magnésio, Fósforo, Manganês, Cobre e Zinco. Potássio diminuiu com o gradiente de concentração de $MnCl_2$ e os teores de Ferro permaneceram constantes.

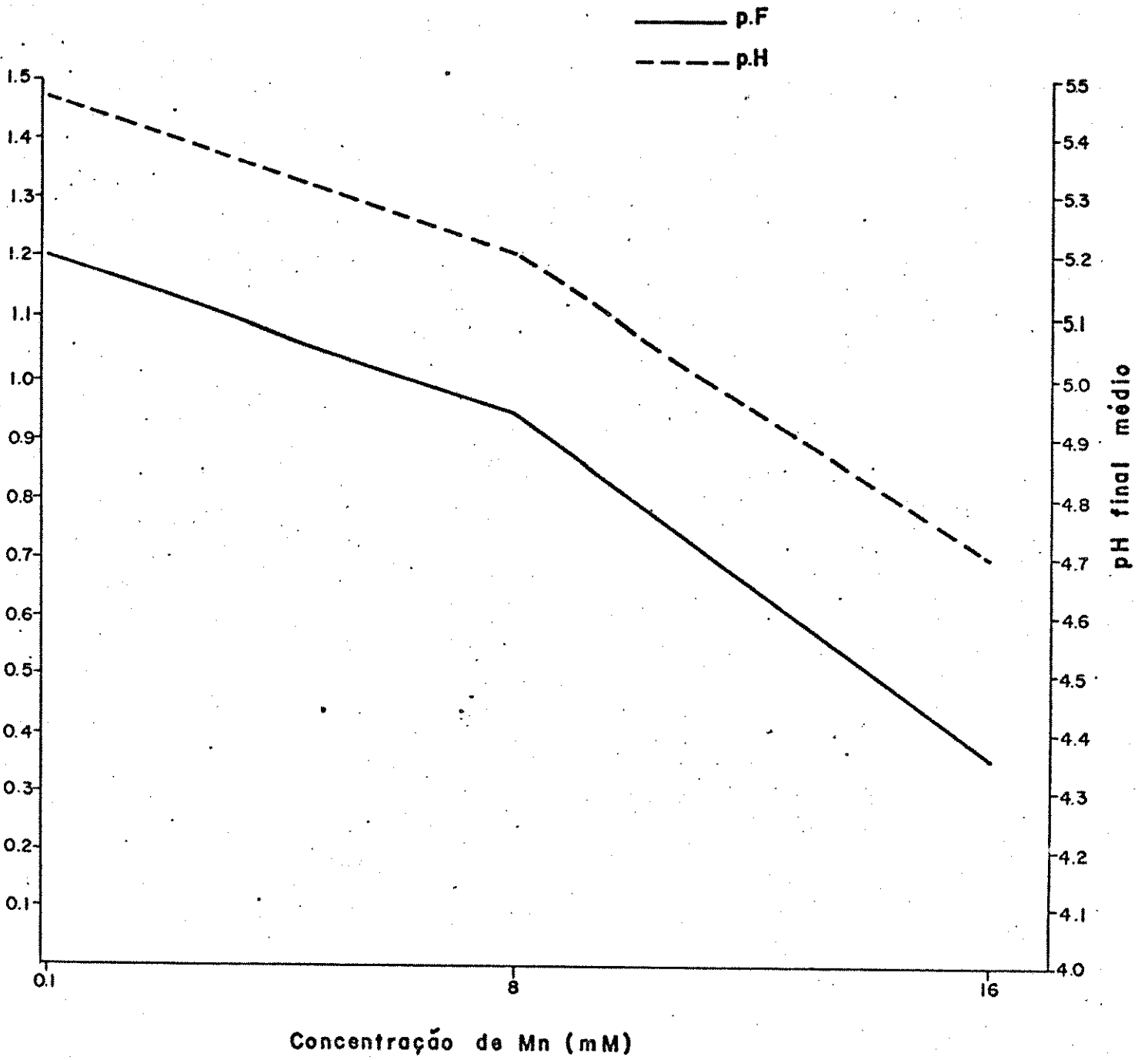
A relação Mn/Fe nos tecidos cresceu em ambas cultivares (Tabela 3 e 4) com a elevação da concentração de Manganês no meio de cultura independente da fonte utilizada. Isso deveu-se mais ao grande aumento da concentração de Manganês nos tecidos de calos do que a variação do teor de Ferro.

5.3. Variação de pH

A literatura menciona o efeito de pH sobre a disponibilidade de Manganês assimilável (Mn^{+2}). Segundo Lindsay (1972), a disponibilidade máxima de Manganês em solução de solo ocorre em pH em torno de 4,0, diminuindo à medida que a solução torna-se alcalina.

Procurou-se em um experimento verificar a influência de pH inicial do meio de cultura sobre a disponibilidade de altas concentrações de Manganês e consequente toxicidade às células de cenoura (Cultivar II) em cultivo.

A proliferação de calos, após 28 dias de cultivo em diferentes valores de pH, não apresentou diferenças de peso fresco em função dos tratamentos de pH inicial utilizados (Tabela 5). A diferença de crescimento observada deveu-se unicamente às concentrações de Manganês adotadas, independentemente dos valores de pH inicial (Fig. 17). Houve diminuição do pH final médio com o aumento



ção do volume de calos formados, após 28 dias de cultura. Houve uma tendência do pH situar-se em torno de um valor final, dependente da concentração de Manganês e do peso fresco final dos calos (Fig. 17). No tratamento 0,1 mM de Manganês o pH final médio ajustou-se em torno de 5,47 e o peso médio 1,20 g; no tratamento 8mM de Manganês o pH final médio foi de 5,2 e o peso médio de 0,94 g e com 16 mM o pH final médio foi de 4,7 e peso médio de 0,36g.

A tendência do pH oscilar em torno de um valor particular para cada concentração de Manganês adotada (0,1; 8,0 e 16,0 mM de mM), ou seja, em função dos pesos frescos dos calos correspondentes a estes tratamentos, sugere uma interação complexa entre célula-meio de cultura (modificação de permeabilidade das membranas, para absorção/excreção de H^+ , K^+ , ácidos orgânicos, etc) nas condições variáveis de pH e Manganês disponível.

Analisando-se os resultados de peso fresco de calos apresentados na Tabela 5, nota-se que existe uma discriminação (toxicidade) das células em função do aumento da concentração de Manganês em meio de cultura para qualquer valor de pH inicial estudado. Isto significa que ocorre uma resposta progressiva aos diferentes níveis exógenos de Manganês. Em consequência destes resultados, resolveu-se adotar um único valor de pH (5,0) nos meios de cultura para selecionar clones de células tolerantes a níveis elevados de Manganês.

5.4. Meio de Murashige e Skoog Modificado

Conhecendo-se a interferência dos ions Fósforo (Bortner, 1935, Heintze, 1968), Cálcio (Robson & Loneragan, 1970; Heenan e Carter, 1976; Shuman & Anderson, 1976) e Magnésio (Mass et al, 1969) sobre a disponibilidade de Manganês, foi realizado um experimento para comparar o efeito de níveis de Fósforo, Cálcio e Magnésio na redu

TABELA 5 - Crescimento de calos de cenoura (cultivar II) em função de diferentes valores de pH inicial (4,0; 4,25; 4,50; 4,75; 5,00 e 5,50) e valores de pH final após 28 dias de cultura. Dados em Peso Fresco (P.F.) expressos em gramas, média de 10 repetições.

pH inicial	0,1 mM Mn		8 mM Mn		16 mM Mn	
	pH final	P.F. (calo)	pH final	P.F. (calo)	pH final	P.F. (calo)
4,00	5,21	1,3515	5,11	1,0337	4,64	0,3119
4,25	5,42	1,2754	5,14	0,9037	4,78	0,2673
4,50	5,34	1,2245	5,22	1,0110	4,85	0,6258
4,75	5,44	1,1556	5,14	0,8467	4,74	0,3490
5,00	5,30	1,0431	5,17	0,9038	4,72	0,3848
5,50	5,48	1,1823	5,19	0,9901	4,60	0,2573
MÉDIA	5,47	1,20	5,20	0,94	4,70	0,36

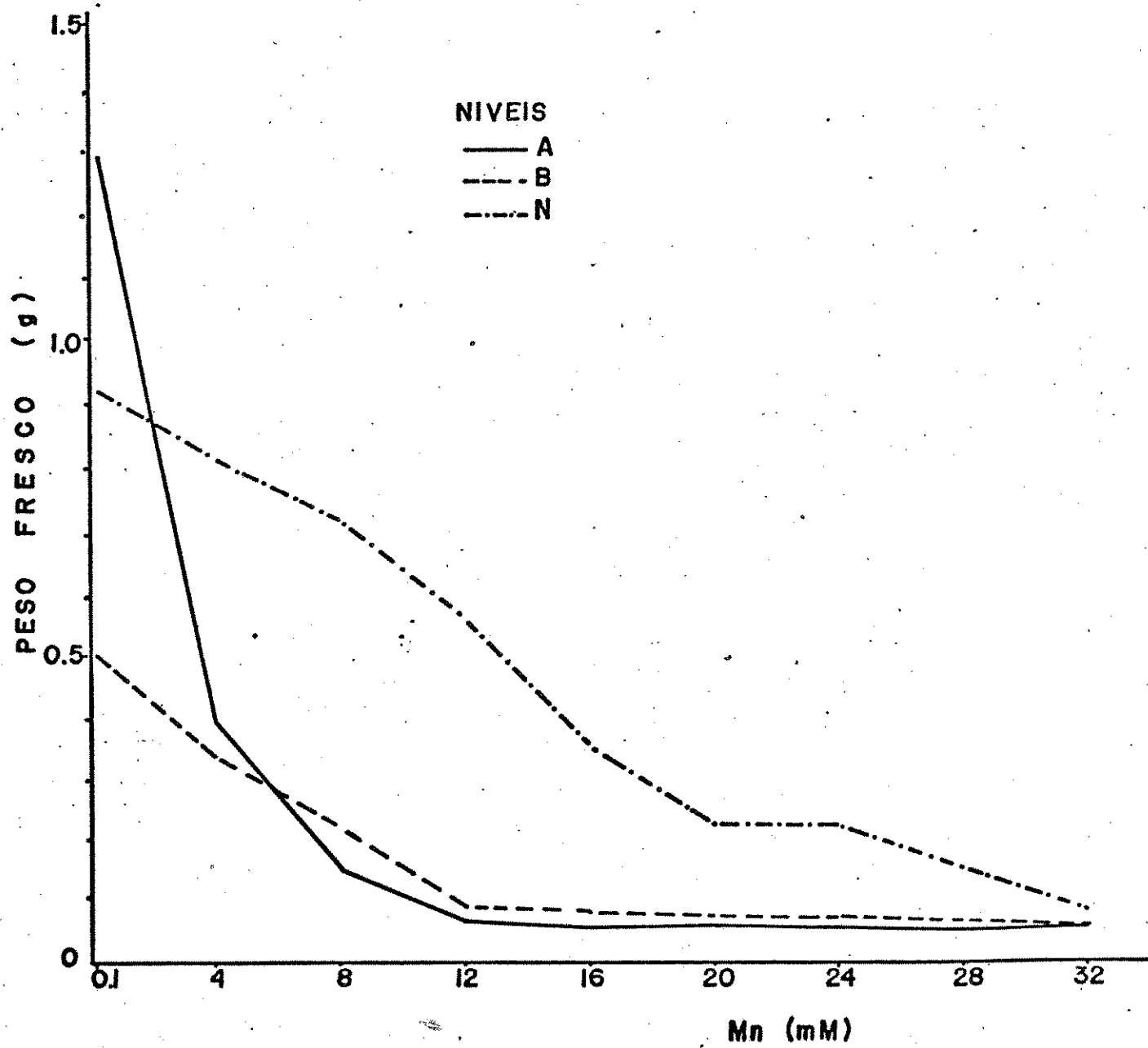
Considerando-se o crescimento de calos na presença de 0,1 mM de Manganês que é o teor normalmente utilizado no meio My rashige e Skoog (1962), o meio de cultura contendo a modificação B não foi favorável para o desenvolvimento de calos (Fig. 18). O crescimento de calos em função de diferentes concentrações de Manganês em meio de cultura (MS-C) contendo as modificações A e B, apresentou uma resposta mais específica do que quando adotou-se os níveis normais de Fósforo, Cálcio e Magnésio (Nível N). Na faixa de concentração de Manganês de 12,0 a 32,0 mM, a redução de crescimento de calos devido as modificações A e B foi total. No nível N não ocorreu inibição total de crescimento de calos na faixa de concentração de Manganês de 0,1 e 28,0 mM. Somente na presença de 32,0 mM de Manganês houve a redução total de crescimento de calos utilizando-se meio de cultura normal (Nível N).

Portanto, observa-se que a disponibilidade do Mn^{+2} depende do balanço de ions da solução. Analisando-se a Fig. 18 pode-se observar que a limitação total de crescimento de células nos meios modificados A e B ocorreu em 12 mM de Manganês e com o meio N ocorreu somente com 32,0 mM de Manganês.

Tendo-se por base estes resultados, adotou-se a modificação A para as seleções posteriores de clones celulares tolerantes a níveis tóxicos de Manganês, porém explorando uma faixa de concentração menor, ou seja, de 0,025 a 8,0 mM em substituição a faixa de concentração de 0,1 a 32,0 mM. O meio de cultura contendo esta modificação A nos níveis de Fósforo, Cálcio e Magnésio passou a ser designado de MS-Cm.

5.5. Esterilização dos Meios de Cultura

Nos experimentos iniciais, utilizando-se um gradien



de de precipitados de cor marron. Esta precipitação crescia com o aumento da concentração de Manganês. Suspeitou-se que o gradiente de Manganês adotado poderia imobilizar alguns inns presentes na solução durante a autoclavagem, ou estaria ocorrendo a complexação de Manganês devido as condições de autoclavagem (alta temperatura e pressão).

Para verificar este efeito, preparou-se duas séries de meios de cultura com o mesmo gradiente de concentração de Manganês (0,025 a 8 mM), submetendo-se cada série a diferentes processos de esterilização: autoclavagem e filtração por membrana Millipore de 0,45 μ m.

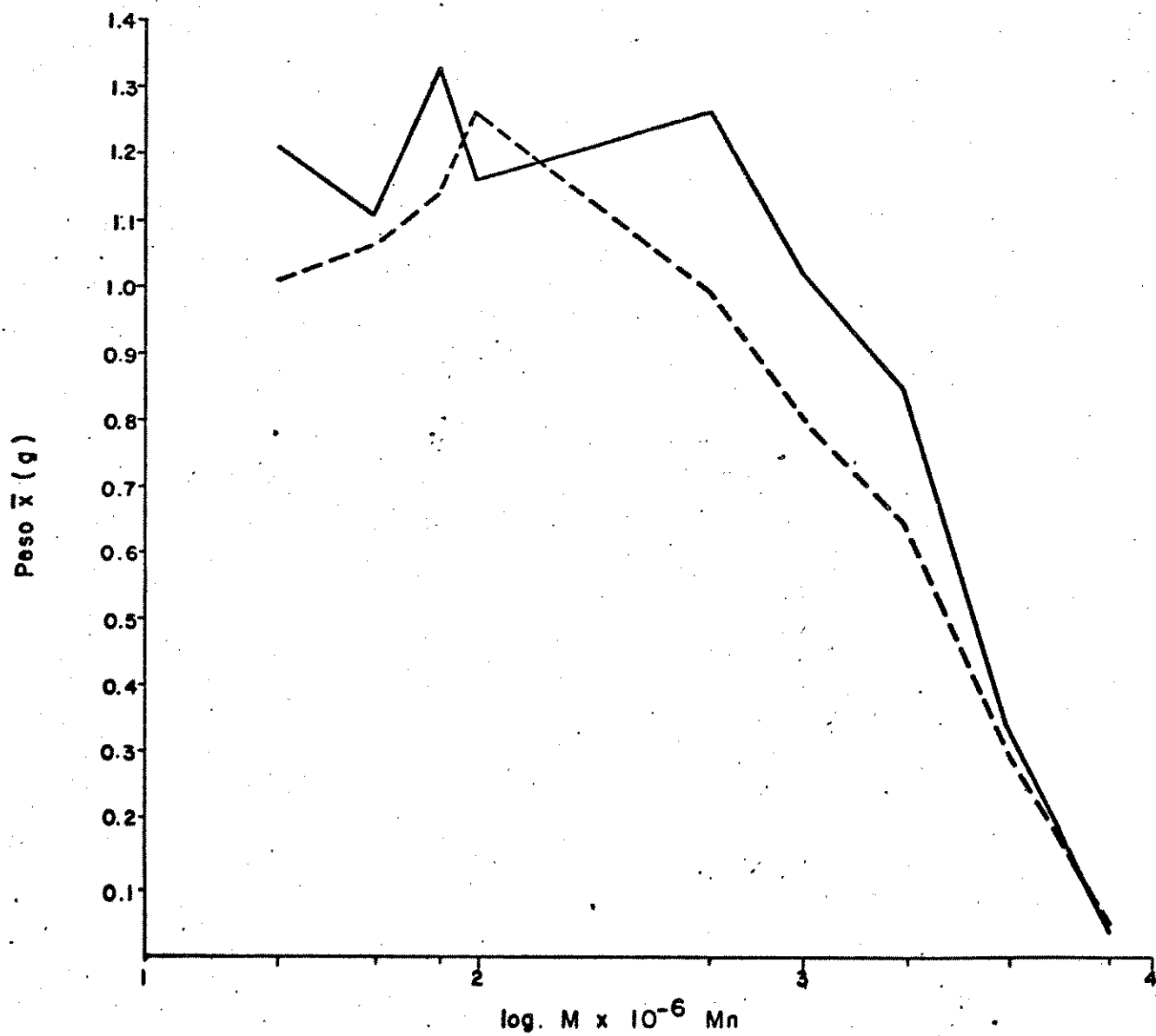
Na faixa de concentração de Manganês de 0,1-2,0 mM o peso fresco de calos dos tratamentos com autoclavagem do meio de cultura foi maior que o peso fresco de calos dos tratamentos com meios esterilizados por filtração e nos níveis 4,0 e 8,0 mM de Manganês não houve diferença (Fig. 19). Isto indica que houve menor inibição de crescimento das células nos meios preparados por autoclavagem, em consequência de maior imobilização de Manganês e/ou outros compostos presentes no meio de cultura.

Devido a estes resultados, a esterilização dos meios de cultura em todos os experimentos em que foi utilizado um gradiente de concentração de Manganês, foi sempre realizada através de filtração por membrana Millipore de 0,45 μ m.

6. Diferenciação Somática

Foi conduzido um experimento em meio sólido, empregando-se células de cenoura provenientes de cultura líquida do cultivar II para avaliar a obtenção de embriões somáticos. A utilização

— AUTOCLAVE
- - - MILLIPORE



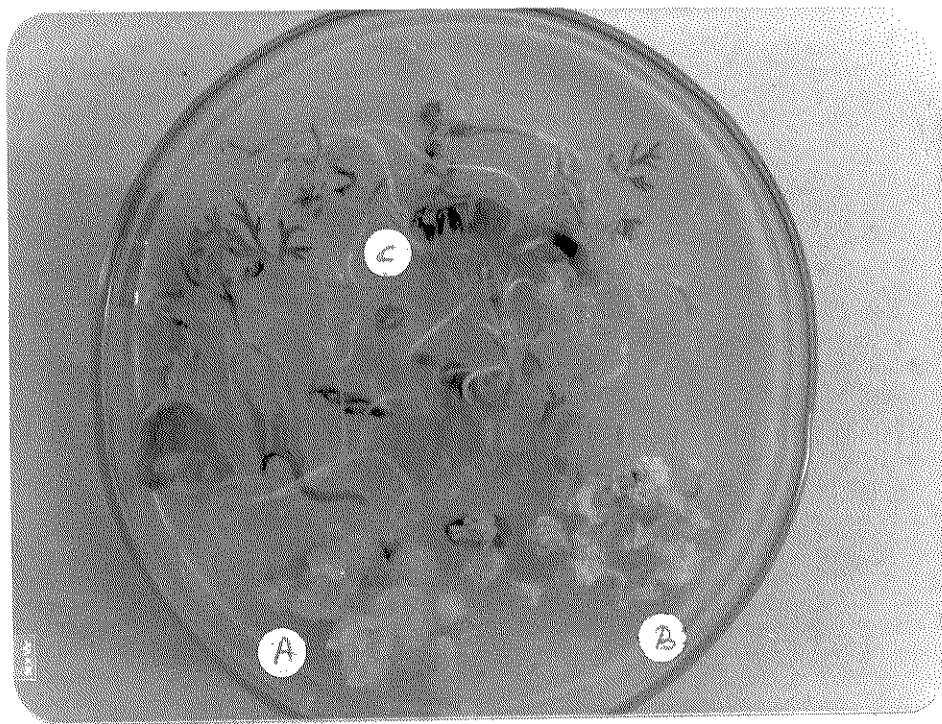
somáticos e plantletes de cenoura. Estes embriões e plantletes podem ser observados na figura 20.

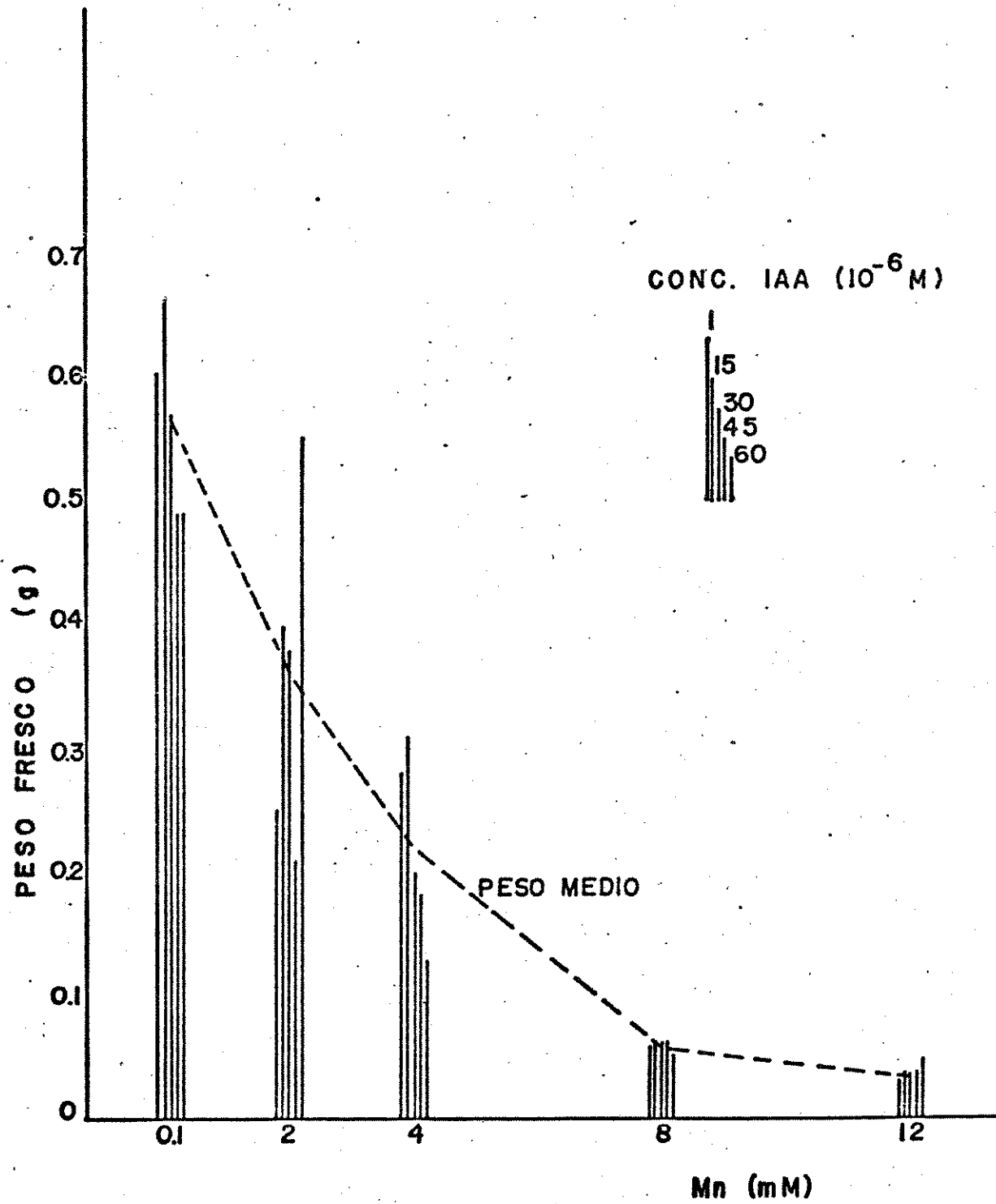
7. Interação IAA x Mn

Existem observações de que o excesso de Manganês exerce antagonismo na absorção de Zinco (Sylvain, 1954; Arzola, 1955; Juang, 1973; Pavan, 1979), conseqüentemente a síntese de triptofano, precursor de IAA, fica prejudicada, uma vez que ions Zinco são requeridos para síntese de triptofano (Wildman, et al., 1947, Tsui, 1948 e Sherwin e Purves, 1969). Por outro lado, o excesso de Manganês aumenta a atividade do sistema IAA-oxidase (Morgan et al., 1966; Stonier et al., 1968). Além disso Mn^{+2} pode oxidar diretamente IAA, com desprendimento de CO_2 (Waigood et al., 1956).

Para avaliar estes efeitos sobre as células de cenoura (cultivar II), foi montado um experimento dialético com cinco concentrações de IAA (1,0; 15,0; 30,0; 45,0 e 60,0 μM) e cinco concentrações de Manganês (0,1; 2,0; 4,0; 8,0 e 12,0 mM) em meio MS-C sólido, suplementado com Kin (2,5 μM).

Observou-se que houve uma diminuição gradativa no peso fresco de calos do cultivar II em função do aumento da concentração de Manganês no meio de cultura, ou seja, as concentrações de IAA adotadas não foram capazes de reverter o efeito tóxico de Manganês (Fig. 21). Notou-se no entanto, uma única exceção; houve uma reversão de inibição de crescimento das células em meio de cultura contendo 60 μM de IAA na presença de 2,0 mM de Mn. Isto sugere que 60,0 μM de IAA é capaz de reverter o efeito tóxico de 2,0 mM de Mn em equilíbrio com outros componentes do meio MS-C. É possível que a adição de concentrações mais elevada de IAA possa re-





8. Seleção de Clones celulares tolerantes ao Excesso de Mn

8.1. Tolerância de Seis Cultivares de Cenoura ao Gradiente de Concentração de Manganês

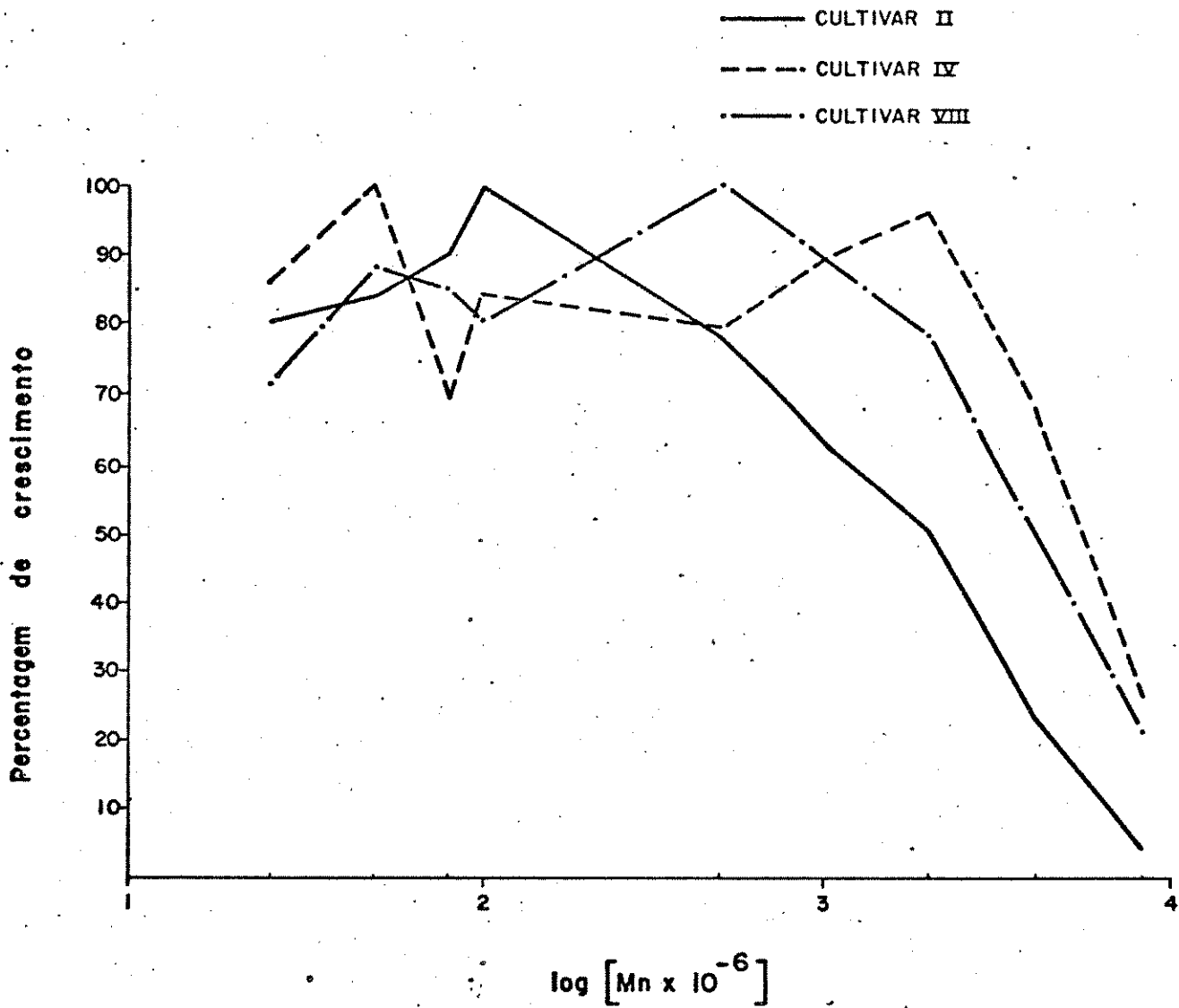
A tolerância de seis cultivares de cenoura a um gradiente de concentração de Manganês (0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mM) foi comparado em meio sólido MS-Cm, suplementado com 10,0 μ M de NAA e 2,5 μ M de Kin. Houve uma nítida diferença de tolerância entre os seis cultivares testados devido a presença de Manganês (Tabela 6). Estes resultados podem ser facilmente comparados observando-se a Figura 22.

O cultivar VII foi o mais tolerante aos níveis de Manganês adotados, apresentando um peso fresco médio de 1,59 g no gradiente de Manganês empregado. Para os demais cultivares os pesos frescos médios foram os seguintes: cultivar II (0,81 g); cultivar IV (0,71 g); cultivar V (0,53 g); cultivar VI (0,41 g) e cultivar VIII (0,18 g).

A concentração máxima de Manganês nos tecidos de três cultivares analisados foi a seguinte: cultivar VII (21.233 ppm à 8 mM de Manganês), cultivar II (8.733 ppm à 4 mM de Manganês) e cultivar V (4.278 ppm à 2,0 mM de Manganês). A dosagem de Manganês nos tecidos destes três cultivares submetidos a um nível de 2,0 mM de Manganês, apresentou os valores de 7.233 ppm, 5.320 ppm e 4.278 ppm, respectivamente para os cultivares VII, II e V (Fig. 23). Estes resultados demonstram mais uma vez que o cultivar VII é o mais tolerante a níveis elevados de Manganês no meio de cultura, uma vez que apresentou maior crescimento de calos na presença de elevados níveis endógenos de Manganês nos tecidos. O cultivar II, que apresentou um crescimento logo abaixo do cultivar VII, também mostrou teores endó

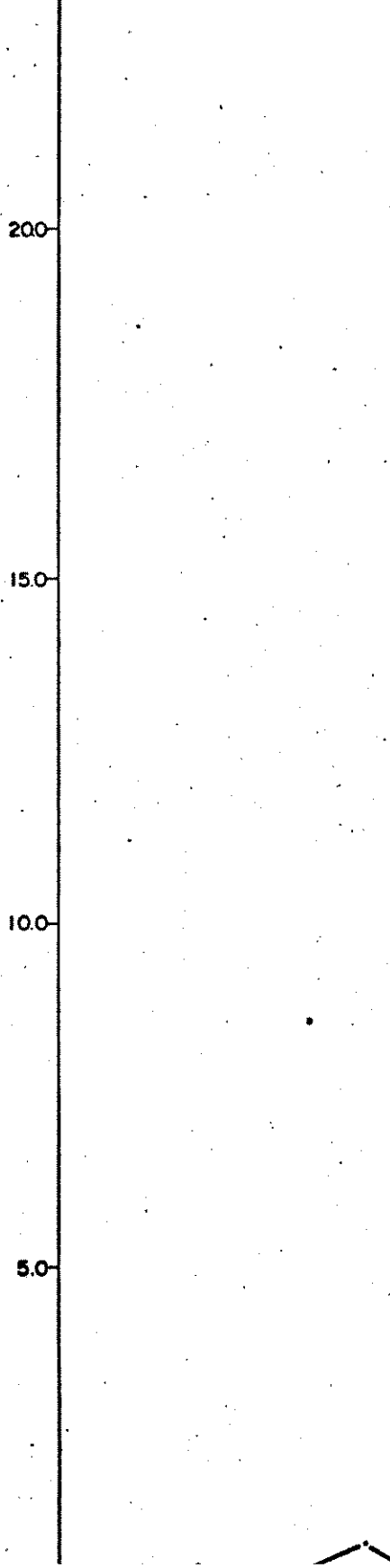
ELA 6 - Média de Peso Fresco (P.F.) de calos e Relação de Crescimento (R.C.: tomando o máximo crescimento de cada cultivar igual a 100%) de cinco cultivares de cenoura submetidos ao gradiente de concentração de Manganês em meio MS-Cm, após 28 dias de cultura no escurão.

NC. (mM)	Cultivar II		Cultivar IV		Cultivar V		Cultivar VI		Cultivar VII	
	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.
25	1,01	80,16	0,79	85,87	0,71	88,75	0,38	62,30	1,57	71,69
50	1,07	84,92	0,92	100,00	0,77	96,25	0,34	55,74	1,93	88,13
75	1,14	90,48	0,64	69,57	0,80	100,00	0,54	88,52	1,87	85,39
00	1,26	100,00	0,78	84,78	0,71	88,75	0,37	60,66	1,77	80,82
00	0,99	78,57	0,73	79,35	0,67	83,75	0,61	100,00	2,19	100,00
00	0,80	63,49	0,82	89,13	0,51	63,75	0,50	81,97	1,95	89,04
00	0,65	51,59	0,89	96,74	0,47	58,75	0,43	70,49	1,49	68,04
00	0,99	23,81	0,63	68,48	0,10	12,50	0,36	59,02	1,11	50,68
00	0,05	3,97	0,24	26,09	0,02	2,50	0,16	26,23	0,45	20,55
IA	0,81		0,72		0,53		0,41		1,59	



250
200
150
100
50

--- Cultivar II
— Cultivar V
-.- Cultivar VII



ções do efeito de toxicidade devido a um gradiente de concentração de Manganês no meio de cultura, realizados pelo crescimento dos tecidos de calos, demonstraram a mesma tendência quando comparados com as análises de concentrações de Manganês endógenas nos tecidos. Acredita-se que o principal mecanismo envolvido na maior tolerância do cultivar VII a níveis elevados de Manganês nos tecidos seja através da complexação com compostos orgânicos. A formação destes complexos tem sido bastante discutido na literatura (Hiatt, 1967; Bremmer, 1967 e Stevenson e Ardakani, 1972).

Uma outra forma de imobilização do excesso de Manganês nos tecidos seria a formação de complexos inorgânicos. Sabe-se que Cálcio, Magnésio, Fósforo e Silício imobilizam Manganês na solução dos solos. Os teores de Cálcio e Magnésio nos tecidos demonstraram uma tendência de diminuição com o aumento de Manganês no meio de cultura. Isto pode sugerir uma competição pelo mesmo sitio ativo de absorção entre Manganês x Cálcio e Magnésio. Por outro lado, o teor de Fósforo nos tecidos aumentou com o gradiente de Manganês no meio de cultura. É possível que este aumento de Fósforo nos tecidos seja um outro mecanismo para imobilizar Manganês nos tecidos, diminuindo seu efeito tóxico.

O cultivar VIII não apresentou crescimento de calos satisfatório no meio de cultura utilizado (MS-Cm, suplementado com 10,0 μ M de NAA e 2,5 μ M Kin) portanto não mostrou nenhuma resposta aos níveis de Manganês empregado. Nota-se que existe uma diferença entre os cultivares de cenoura utilizados quanto ao nível ótimo de Manganês para o crescimento de calos: cultivar VII (0,5 mM); cultivar II (0,1 mM Mn); cultivar IV (0,05 mM Mn); cultivar V (0,075 mM Mn) e cultivar VI (0,5 mM Mn) (Tabela 6, fig. 22).

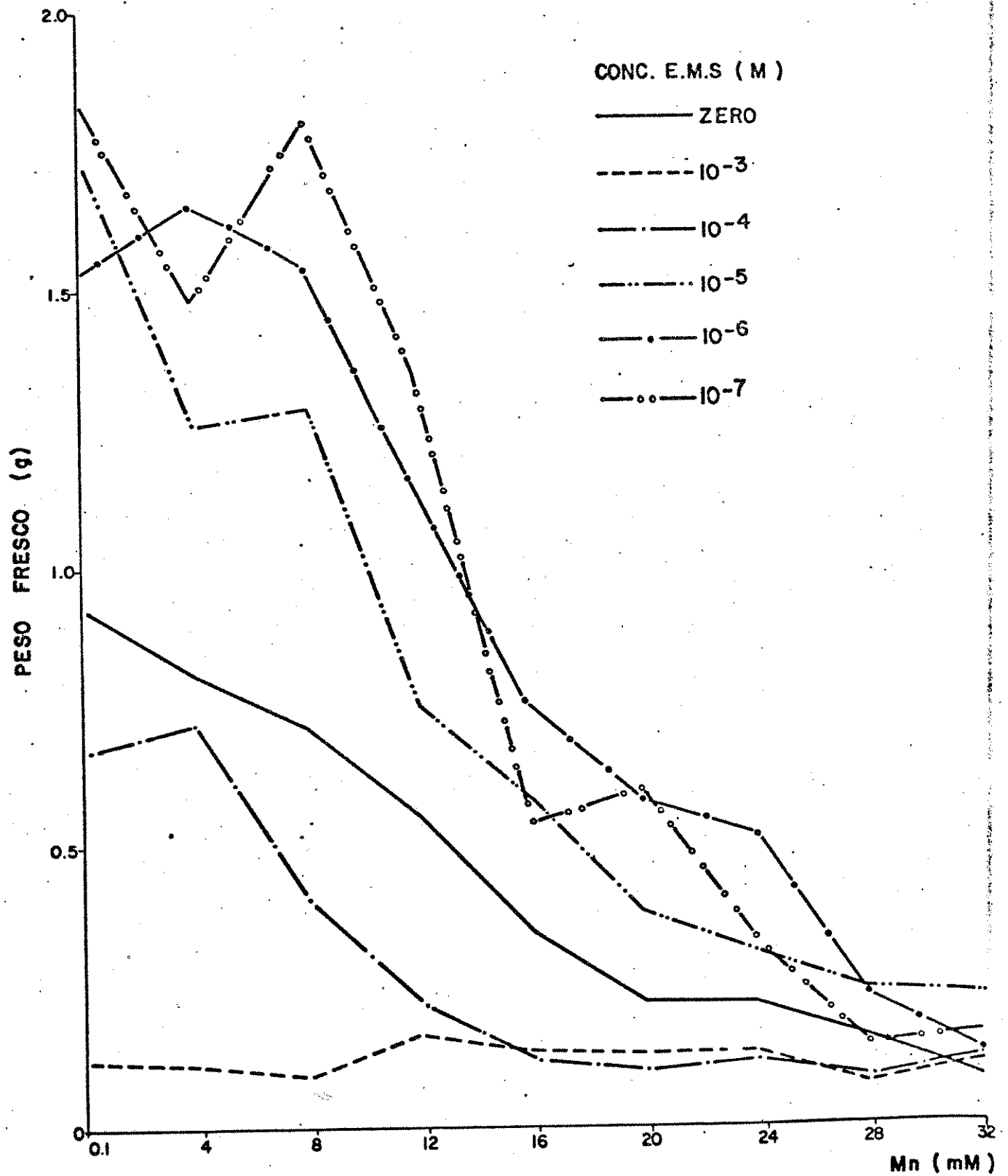
8.2. Indução e Seleção de Clones Mutantes

mutação gênica e possivelmente permitir o isolamento de clones tolerantes do cultivar II a níveis elevados de Manganês. Inicialmente procurou-se conhecer a melhor concentração e tempo de exposição deste mutagênico para as células em suspensão do cultivar II.

Em um primeiro experimento, as células foram expostas ao EMS durante 6 horas nas seguintes concentrações: 0,0; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} e 10^{-7} M. Os resultados destes tratamentos aparecem na Figura 24. Nota-se que as concentrações 10^{-3} e 10^{-4} M de EMS foram tóxicas, pois os pesos frescos de calos derivados das células tratadas foram inferiores aos do controle em toda a faixa de concentração de Manganês testada (Tabela 7).

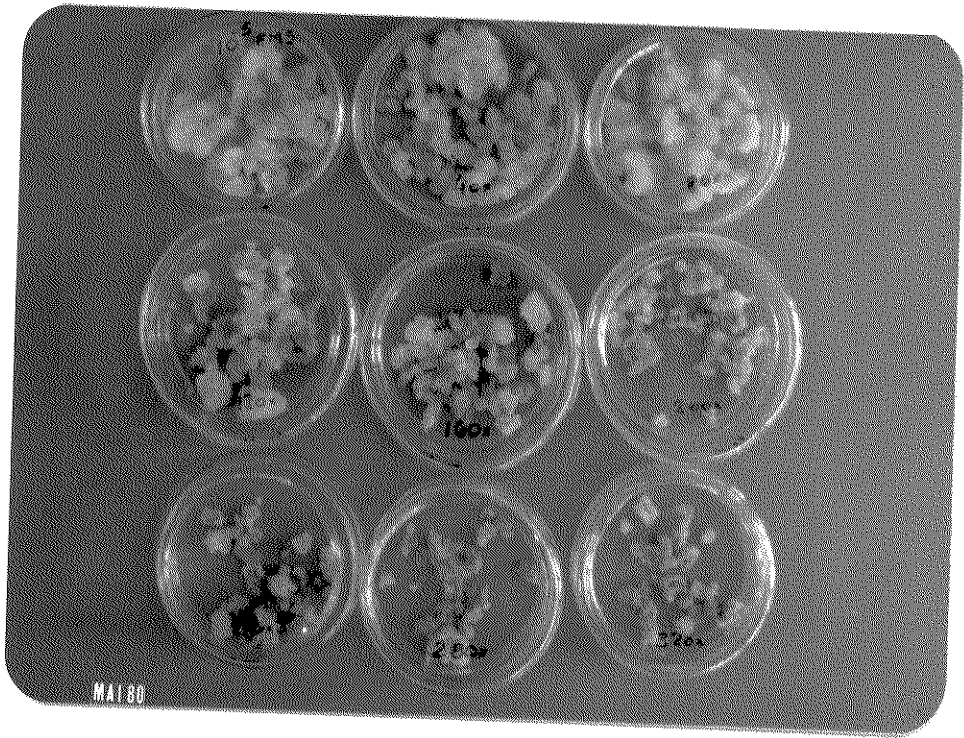
Os calos derivados dos tratamentos 10^{-5} ; 10^{-6} e 10^{-7} M EMS tiveram pesos frescos semelhantes, porém superiores ao controle (sem EMS), bem como as respectivas relações de crescimento (Tabela 7). Os clones derivados de cada concentração de Manganês a partir das células tratadas com 10^{-5} M EMS apresentaram melhor aspecto de cor e textura em relação aos calos derivados de 10^{-6} e 10^{-7} M de EMS. O tratamento de 10^{-5} EMS foi capaz de induzir maior peso fresco de calos nas concentrações mais elevadas de Manganês (28 e 32 mM) (Tabela 7, Fig. 25). Os calos derivados das células tratadas com 10^{-7} M de EMS apresentaram um crescimento máximo (peso fresco) na concentração de 8 mM Mn. De cada concentração de Manganês, clones celulares foram derivados e posteriormente transferidos para meio de cultura visando diferenciação de embriões somáticos na presença dos níveis de Manganês respectivos.

Um segundo experimento de EMS foi montado, no qual as células em suspensão (cultivar II) foram tratadas durante 12 horas na presença das seguintes concentrações deste mutagênico: 0,0; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} e 10^{-9} M. Os calos derivados destas células tratadas apresentaram pesos frescos médios superiores aos do controle (Tabe



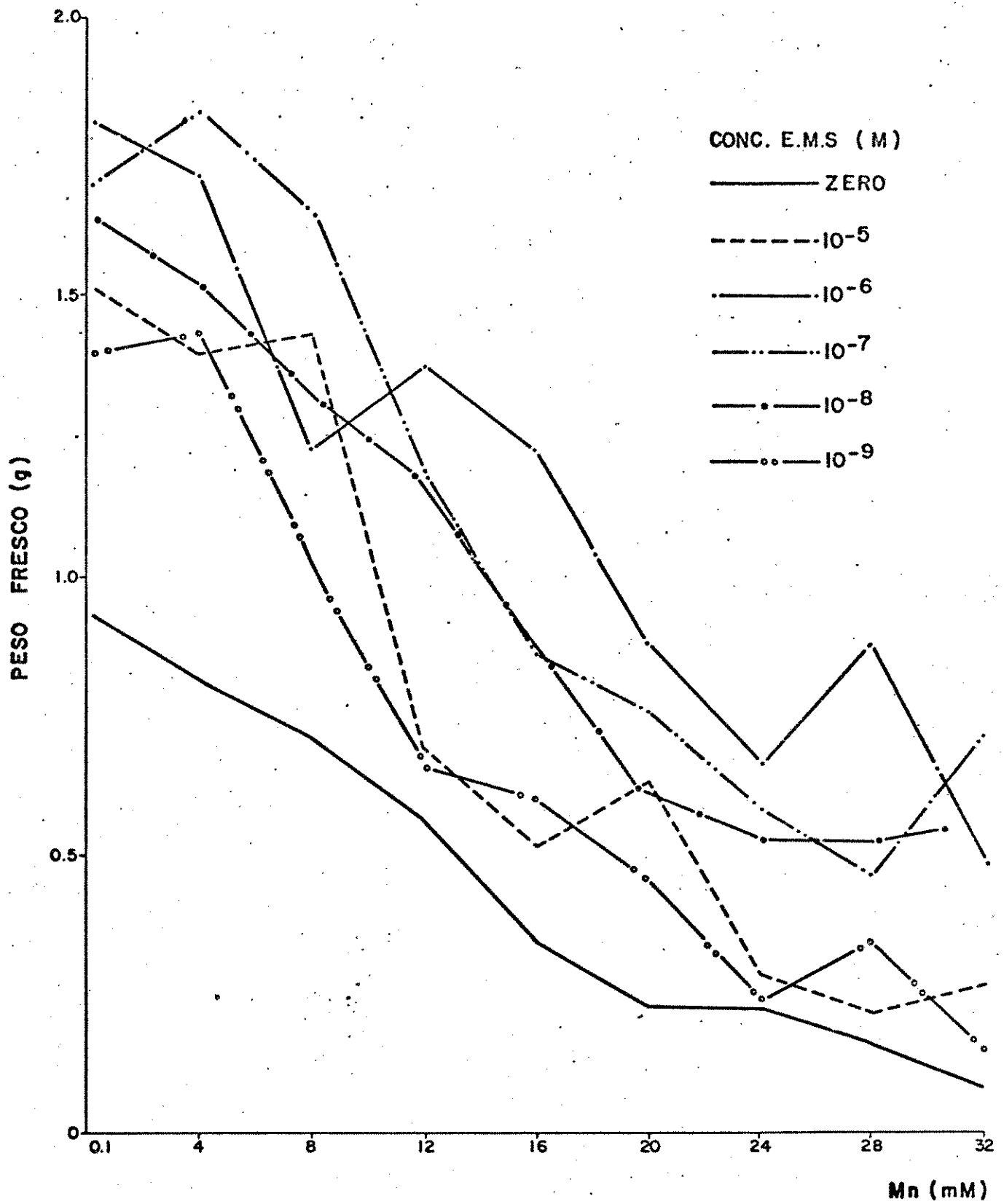
LA 7 - Crescimento de calos de cenoura (cultivar II) submetidos a diferentes concentrações de EMS (0,0; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} e 10^{-7} M) durante 6 horas. Dados de Peso fresco (P.F.) expressos em gramas após 28 dias de cultivo no escuro e Relação de Crescimento (R.C.), tomando o peso fresco de controle igual a 1,0.

c. Mn.	EMS (M) CONCENTRAÇÕES													
	10^{-3}			10^{-4}			10^{-5}			10^{-6}			10^{-7}	
	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.
	0,9275	1,0	0,1170	0,13	0,6680	0,72	1,7208	1,86	1,5277	1,65	1,8258	1,97		
	0,8184	1,0	0,1011	0,12	0,7195	0,88	1,2631	1,54	1,6504	2,02	1,4795	1,81		
	0,7149	1,0	0,0895	0,3	0,3997	0,56	1,5486	1,80	1,5486	2,17	1,8007	2,52		
	0,5556	1,0	0,1579	0,28	0,2214	0,40	1,1360	1,36	1,1360	2,04	1,3335	2,40		
	0,3492	1,0	0,1331	0,38	0,1362	0,39	0,5831	1,67	0,7540	2,16	0,5440	1,56		
	0,2224	1,0	0,1238	0,56	0,0917	0,41	0,3810	1,71	0,5856	2,63	0,6018	2,71		
	0,2245	1,0	0,1373	0,61	0,1232	0,55	0,3097	1,38	0,5230	2,33	0,3327	1,48		
	0,1551	1,0	0,0725	0,47	0,7006	0,46	0,2487	1,60	0,2316	1,49	0,1467	0,95		
	0,0854	1,0	0,1090	1,28	0,1174	1,37	0,2386	2,79	0,1394	1,63	0,1681	1,97		
A	0,4503	1,0	0,1157	0,44	0,2831	0,64	0,7547	1,75	0,8966	2,01	0,9147	1,93		



18 - Crescimento de calos de cenoura (cultivar II) submetidos a diferentes concentrações de EMS (0,0; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} e 10^{-9} M) durante 12 horas. Dados de Peso Fresco (P.F.) expressos em gramas após 28 dias de cultivo no escuro e Relação de Crescimento (.R.C.) tomando o peso fresco do controle igual a 1,0.

Mn.	EMS (M) CONCENTRAÇÕES											
	10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}		10^{-8}		10^{-9}			
	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.	P.F.	R.C.
0	0,9275	1,0	1,7104	1,84	2,0960	2,26	1,8957	2,04	1,8414	1,99	1,5923	1,72
	0,8184	1,0	1,5895	1,94	1,9097	2,33	2,0348	2,49	1,7219	2,10	1,6354	2,00
	0,7149	1,0	1,6359	2,29	1,4200	1,99	1,8461	2,58	1,5233	2,13	1,2362	1,73
	0,5556	1,0	1,8902	3,40	1,5683	2,82	1,3863	2,50	1,3611	2,45	0,9656	1,74
	0,3492	1,0	0,7089	2,03	1,4202	4,07	1,0571	3,03	1,0832	3,10	0,8096	2,32
	0,2224	1,0	0,8280	3,72	1,0717	4,82	0,9498	4,27	0,8149	3,66	0,6624	2,98
	0,2245	1,0	0,8280	2,18	0,8646	3,85	0,7758	3,46	0,7318	3,26	0,4483	2,00
	0,1551	1,0	0,4202	2,71	1,0800	6,96	0,6641	4,28	0,7208	4,65	0,5414	3,49
	0,0854	1,0	0,4713	5,52	0,6760	7,92	0,9180	10,75	0,7642	8,95	0,3541	4,15
	0,4503	1,0	1,1202	2,82	1,3452	4,11	1,2808	3,93	1,1736	3,59	0,9160	2,46



calos oriundos do tratamento 10^{-6} M EMS, apresentaram maior crescimento de calos, conforme pode ser visto pelos valores de peso fresco médio e pelas médias da relação de crescimento (Tabela 8). Os clones celulares que proliferaram nos diferentes níveis de Manganês foram transferidos para meios de cultura indutor contendo as concentrações respectivas de Manganês, visando a obtenção de plantas.

Baseando-se nestes dois experimentos pode-se concluir que 10^{-5} M EMS durante 6 horas, ou 10^{-6} - 10^{-7} M EMS por 12 horas são recomendáveis para experimentos de indução de mutação a partir de células em suspensão do cultivar II. A maior proliferação de calos a partir de células em suspensão submetidas a um gradiente de concentração de Manganês (MS-C) foi obtida em tecidos derivados dos tratamentos com 10^{-6} M de EMS durante 12 horas (peso fresco médio de 1,34 g).

Num terceiro experimento a incubação de $1,6 \times 10^7$ células do cultivar II em 10^{-5} M EMS durante 6 horas, permitiu o isolamento de vários clones celulares selecionados na presença de níveis crescentes de Manganês (Fig. 27). O número médio de colônias (clones) formados nos tratamentos de Manganês de 0,025; 0,075; 0,5 e 2,0 mM foram semelhantes (em torno de 30 colônias). Ao nível de 8 mM Mn, foram isolados, em média de 3,7 colônias tolerantes a este nível de Manganês no meio de cultura (Tabela 9). O efeito do tratamento com EMS pode ser avaliado quando se compara a obtenção de clones tolerantes a Manganês, a partir de células em suspensão do cultivar II, tratadas e não tratadas com este mutagênico. Células não submetidas ao EMS permitiram o isolamento de clones somente até o nível de 4 mM Mn (Tabela 6), enquanto que utilizando-se 10^{-5} M de EMS/6 horas foi possível isolar clones até 8 mM de Mn (Tabela 9). Estes dados não podem ser comparados com os valores

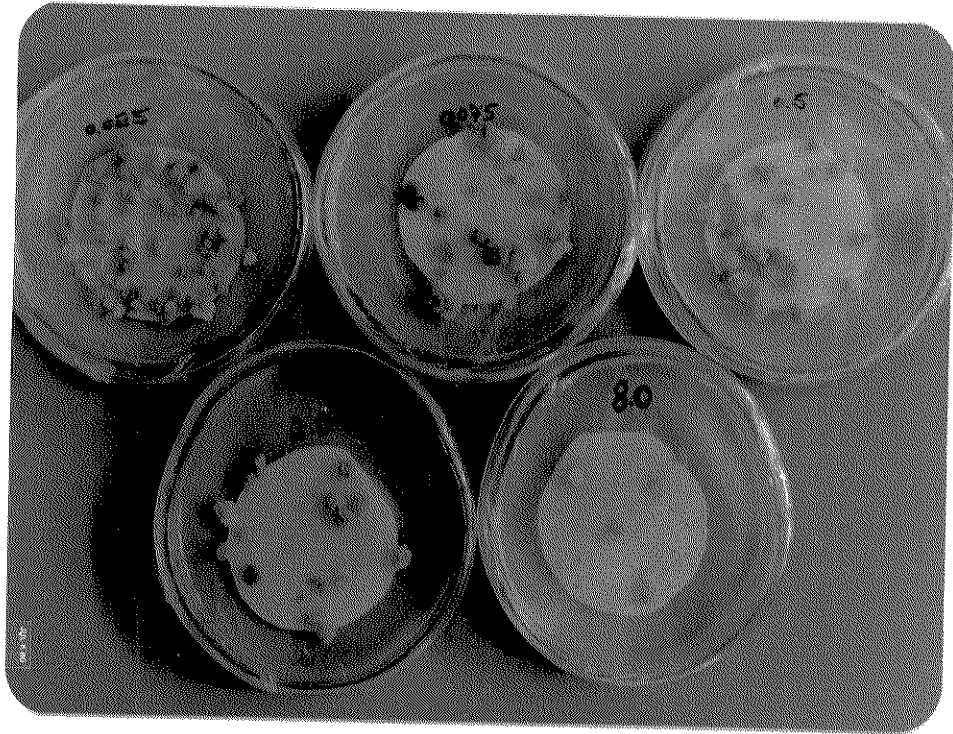


TABELA 9 - Número de colônias (calos) do cultivar II, formados após tratamento com 10^{-5} M EMS por 6 horas cultivadas em meio MS-Cm, durante 60 dias, submetidas a um gradiente de concentração de Mn^{+2}

Conc. Mn (mM)	Placa nº				MÉDIA
	1	2	3	4	
0,025	17	36	27	55	33,7
0,075	62	13	25	*	33,3
0,500	30	18	27	27	25,5
2,000	33	19	55	16	30,7
8,000	1	3	7	*	3,7

* Contaminação.

tura utilizado foi MS-C e não MS-Cm. Clones tolerantes a níveis acima de 8 mM de Mn possivelmente poderiam ser também isolados, no entanto em todos os experimentos utilizando-se o cultivar II em meio MS-Cm, o nível máximo de Manganês utilizado foi 8 mM. Os clones derivados deste experimento foram transferidos para meio condicionante (MS-C - 3,5 uM 2,4-D) por 15 dias e transferidos novamente para meio indutor (MS-C sem reguladores de crescimento). Embriões e plantletes destes clones tolerantes a níveis elevados de Manganês, assim que regenerados deverão ser, submetidos a testes finais de vasos e campo.

V - CONCLUSÕES

Verificou-se que o método de esterilização externa mais eficiente e que permite melhor proliferação de calos, foi a raspagem da epiderme da raiz seguido de imersão em solução de 2,6% de hipoclorito de sódio durante 30 minutos. Os calos obtidos foram oriundos predominantemente da região do floema secundário.

Dos meios de cultura testados, visando indução de calos de 8 cultivares a partir de segmentos de raiz, verificou-se que o meio MS-C suplementado com 5 μ M de 2,4-D e Kin permitiu uma indução ótima de calos para os cultivares IV, V e VII. Para os cultivares II e III a melhor combinação foi 10 μ M 2,4-D e 2,5 μ M Kin. Para o cultivar I o melhor crescimento foi obtido com 1 μ M 2,4-D e 2,5 μ M Kin, enquanto que para o cultivar VI foi 1,0 μ M 2,4-D e 5,0 μ M Kin. Finalmente para o cultivar VIII, a melhor combinação foi 2,5 μ M 2,4-D e 5,0 μ M Kin. As exigências dos cultivares tratados para adição exógena de fitorreguladores pode ser resumida da seguinte forma: a) 2,4-D 1,0 μ M (cultivares I e VI); 2,5 μ M (cultivar VIII); 5,0 μ M (cultivares IV, V e VII) e 10,0 μ M (cultivares II e III). b) Kin 2,5 μ M (cultivares, I, II e III); 5,0 μ M (cultivares IV, V, VI, VII e VIII).

Para estabelecimento de cultura de células em suspensão, a partir de calos do cultivar II, notou-se a necessidade de 2,5 μ M Kin na presença de 2,4-D (5,0 μ M) ou NAA (10,0 μ M). A adição de hidrolisado de caseína (2 g/l) não melhorou o crescimento de células em meio líquido. A concentração inicial do inóculo deve situar-se entre 10^4 - 10^5 células/ml. Para manutenção das culturas líquidas, a adição de 30% de meio líquido a cada 2 - 3 dias foi suficiente para manter a viabilidade e o crescimento das células em suspensão. Utilizando o meio MS-C suplementado com 10,0 μ M NAA,

2,5 μM Kin, foi encontrado que a densidade máxima permitida é de $1,25 \times 10^5$ células/ml.

A obtenção de calos a partir de células em suspensão apresentou maior peso fresco de calos quando se utilizou o meio MS-C suplementado com Kin/NAA na concentração de 5,0/2,5 μM . Subcultura periódica a cada 4 semanas garantiu uma ótima manutenção de calos obtidos.

A fonte MnCl_2 permitiu maior peso fresco de calos (cerca de 30%) quando comparado com a fonte MnSO_4 , na faixa de concentração de 0,1 a 32,0 mM. O aumento da inibição de crescimento de calos foi proporcional ao aumento da concentração de Manganês presente no meio de cultura para ambas as fontes. No entanto, os tecidos cultivados na presença de MnSO_4 apresentaram maior teor em d \acute{o} geno de Manganês.

A faixa de pH inicial testada, não apresentou alteração na disponibilidade de Manganês. O pH final oscilou de acordo com os pesos frescos finais dos calos obtidos nos diferentes tratamentos de Manganês.

A modificação mais favorável do meio MS-C que permitiu maior disponibilidade de Manganês foi: 0,125 mM P, 0,3 mM Ca e 0,75 mM Mg. Com esta modificação, o nível 0,1 mM Mn permitiu ótimo crescimento de calos para o cultivar II e a concentração de 8 mM Mn foi completamente inibitória. Essa modificação do meio de cultura permitiu maior liberação de Mn^{+2} , permitindo diminuir o gradiente de Manganês de 0,1 a 32,0 mM para 0,025 a 8,0 mM.

O processo de esterilização do meio de cultura por filtro de membrana permitiu menor imobilização de Manganês, consequentemente maior liberação de Mn^{+2} .

Das concentrações de IAA testadas 1 a 60 μM , somente

do gradiente de concentração de Manganês adotado (0,1 a 12,0 mM).

Dos seis cultivares de cenoura estudados o cultivar VII foi o mais tolerante ao gradiente de Manganês adotado (0,025 a 8,0 mM), apresentando um peso fresco médio de 1,59 g/calor contra 0,41 g/calor do cultivar VI, o menos tolerante.

Considerando o peso fresco médio dos calos no gradiente de Manganês adotado, os seis cultivares estudados apresentaram tolerância a este elemento na seguinte ordem: VII (1,59 g), II (0,81 g), IV (0,72 g), V (0,53 g) e VI (0,41 g). A análise do teor de Manganês nos tecidos desenvolvidos em meio de cultura contendo 2 mM Mn, revelou que o cultivar VII foi o mais tolerante (7.233 ppm), seguido do cultivar II (5.320 ppm) e V (4.278 ppm). Portanto o cultivar VII que apresentou maior peso fresco de calos, foi também o que tolerou maiores teores de Manganês endógeno em todo o gradiente de Manganês utilizado. O cultivar II, que foi o segundo mais tolerante ao gradiente de Manganês no meio de cultura, também apresentou teores endógenos de Manganês logo abaixo dos teores encontrados no cultivar VII.

Pode-se concluir que a avaliação de crescimento de calos (peso fresco ou índice de crescimento) é válido para estudos de tolerância/suscetibilidade a níveis elevados de Manganês.

Na incubação de EMS durante 6 horas, as concentrações de 10^{-3} e 10^{-4} M foram tóxicas para as células em suspensão do cultivar II, enquanto que as concentrações 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M EMS são recomendadas.

O tratamento de $1,6 \times 10^{-7}$ células com 10^{-5} M de EMS, subdividido em 20 alíquotas permitiu o isolamento de clones tolerantes a 2,0 e 8,0 mM Mn.

VI - RESUMO

Tecidos de cenoura foram obtidos da região do floema secundário de raízes adultas de oito cultivares a fim de testar a tolerância/susceptibilidade a níveis elevados de Manganês. Os cultivares estudados apresentavam diferenças quanto a exigência de reguladores de crescimento para indução de calos. Culturas líquidas foram obtidas a partir de um inóculo inicial de $10^4 - 10^5$ células/ml. A concentração máxima de células em suspensão foi de $1,25 \times 10^5$ células/ml, com renovação de 30% de meio de cultura a cada 2 - 3 dias.

A fonte $MnCl_2$ permitiu maior peso fresco dos calos quando se empregou uma faixa de concentração de Manganês de 0,1 a 32,0 mM. A fonte $MnSO_4$ determinou maior teor de Manganês endógeno nos tecidos. Não foi observada diferença de crescimento em função do pH inicial. A adição de 1,0 a 60,0 μM de IAA não alterou os resultados de crescimento de calos na presença do gradiente de concentração de Manganês. A redução nos teores de Fósforo, Cálcio e Magnésio do meio de cultura inicial, permitiu maior disponibilidade de Manganês. Adotando-se este meio modificado, a faixa de concentração de Manganês, onde os tecidos dos cultivares estudados apresentaram variações de tolerância/susceptibilidade, foi de 0,025 e 8,0 mM.

O cultivar VII (meio comprida precoce, IAC-2787), apresentou tolerância a 8,0 mM de Manganês presente no meio de cultura modificado. Este cultivar apresentou o maior teor de Manganês nos tecidos (21.233 ppm) na presença de 8,0 mM de Manganês no meio de cultura.

A utilização do Etil Metano Sulfonato ($EMS \cdot 10^{-6}$ M/12 horas), permitiu selecionar clones de células do cultivar II mais

mo cultivar não tratadas com este mutagênico. Quando se tratou $1,6 \times 10^7$ células do cultivar II com 10^{-5} M de EMS/ 6 h, foram selecionados clones tolerantes à 8,0 mM de Manganês em contraste aos clones tolerantes à 4,0 mM de Manganês derivados de células não tratadas.

VII - SUMMARY

Carrot tissue were obtained from the secondary phloem region of adult roots from eight cultivars in order to test the tolerance/susceptibility to high levels of manganese. The cultivars studied showed differences in requirements of growth regulator for induction of callus. Liquid cultures were obtained from an initial inoculum of $10^4 - 10^5$ cells/ml. The maximum concentration of cells in suspension was 1.25×10^5 cells/ml, with renewal of 30% of culture medium at 2 - 3 days interval.

The $MnCl_2$ as source of Mn allowed higher fresh weight of callus when the concentration of manganese was between 0.1 to 32.0 mM. The $MnSO_4$ as source of Mn gave higher concentration of endogenous manganese in the tissue. No differences in growth were observed due to the initial pH.

The addition of 1.0 to 60.0 μM of IAA did not change callus growth when concentration of manganese was changed. The reduction in the concentration of phosphorus, Calcium and magnesium in the initial culture medium provided higher availability of manganese. With this modified medium, the range in manganese concentration in which the tissue of the cultivars studies showed variation in tolerance/susceptibility, was from 0.025 to 8.0 mM.

The cultivar II (mid-length early, IAC-2787), showed tolerance to 8.0 mM of manganese present in the culture medium in which phosphorus, calcium and magnesium were reduced. This cultivar showed the highest concentration of Manganese in the tissue (21.233 ppm in the presence of 8.0 mM of manganese).

The use of Ethyl Methane Sulfonate ($10^{-6} M$ EMS/12 hours), allowed selection of clones of cells of cultivar II more tolerant (about four times more) to manganese than cells of this same cul

cultivar II were treated with 10^{-5} M of EMS/6 hours, clones tolerant to 8.0 mM of manganese were selected in contrast to clones tolerant to 4.0 mM of manganese derived from untreated cells.

VIII - BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, F. and WEAR, J.I. 1957. Manganese toxicity and soil acidity in relation to crinckle leaf of cotton. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 21: 305-308.
- ARNON, D.I. 1950. Criteria of essentiality of inorganic micronutrients for plants, with special reference to molybdenum, p. p. 31 - 39. In trace elements in plant physiology. Chronica Botanica, Waltham, Mass. 144 pp.
- ARZOLA, J. Dal P. 1955. Contribuição ao estudo da absorção e da translocação do Rádio Zinco no cafeeiro (*Coffea arabica*, L.); Tese de doutoramento apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, SP.
- BACHOFEN, R. 1966. Die Onyclation von Mangan durch chloroplasten im hicht. Z. Naturforsch. 216:278-284.
- BATAGHLIA, O.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, A.M.C. e GALLO, J. R. 1978. Análise Química de Plantas. Circular nº 87. Inst. Agron. de Campinas. 31 pp.
- BINDING, H.E. 1972. Selection in callus cultures containing haploid cells Zeitschrift für Pflanzenzüchtung, 67 (1): 33-38, 1972.
- BORTNER, C. 1935. Manganese toxicity in tobacco. Soil Sci. 39: 15-33.
- BOWEN, J. E. 1969. Absorption of copper, and manganese by sugar cane tissue. Plant Physiol. 44: 255-261.
- BREMNER, J.M. 1967. Nitrogenous compounds. p. 19-66. In: A.D. McClaren and G.H. Peterson (eds). Soil biochemistry. Marcel Dekker Inc. New York.

- BREMNER, J.M. and KNIGHT, A.H. 1970. The complexes of zinc, copper, and manganese present in ryegrass. *Br. J. Nutr.* 24: 279-89.
- BROWN, T.E., H.C. Eyster and H.A. Tanner, 1958. Physiological effects of manganese deficiency p.p. 135-155. In C.A. Lamb, O.G. Bentley and J.M. Beattie (eds) Trace elements (Proc. Conf. Ohio Agr. Exp. Sta. Wooster, Ohio, Oct. 14-16, 1957). Academic. New York, 410 pp.
- CALDAS, L.S. 1971. Effects of various growth hormones on the Production of Embryoides from tissue culture of the wild carrot, Daucus carota L., Tese PhD., apresentada a Universidade de Ohio, Columbus, USA.
- CARLSON, P.S. 1973. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science.* 180: 1366.
- CARLSON, P.S. 1970. Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of Nicotiana tabacum. *Sci.* 168: 487-489.
- CHANIAE, G., and I.F. MARTIN 1969. Photoreactivation of manganese catalyst in photosynthetic oxygen evolution. *Plant Physiol.* 44: 351-360.
- CHANIAE, G., and I. F. MARTIN 1966. Studies on the function of manganese in photosynthesis. *Brookhaven Symp. Biol* 19: 406-417.
- COMMITTEE ON BIOLOGIC EFFECTS OF ATMOSPHERIC POLLUTANTS. 1973. Manganese National. Academy of Sciences. Washington, D.C.
- DIECKERT, J.W. and ROZAKY, R. 1969. Isolation and partial characterization of manganin, a new manganoprotein from peanut seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 134: 473-77.
- DIX, P.J. & STREET, H.E. 1975. Sodium chloride resistant cultured cell lines from Nicotiana sylvestris and Capsicum annum. *Plant Sci. Letters.* 5: 231-237.

- DOBEREINER, J. 1966. Manganese toxicity effects on nodulation and fixation in beans (Phaseolus vulgaris, L.) in acid soils. Plant Soil 24: 153-66.
- ELLIOTT, W.H. 1953. Isolation of glutamine synthetase and glutamate transferase from green peas. J. Biol. chem. 201: 661-672
- EYSTER, D., T.E. BROWN, H.A. TANNER, and S. L. HOOD 1958. Manganese requirement with respect to growth, hill reaction and photosynthesis. Plant Physiol. 33: 235-241.
- FOY, C.D., CHANEY, R.L. & WHITE, M.C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 29: 511-566.
- FOY, C.D., 1973. Manganese and plants. In: Manganese, pp. 51-76. Washington, D.C. National Academy of Sciences. Nat. Res. Conc. 191 pp.
- FOY, C.D. 1978. Acid Soil toxicity. Effects of nutrient deficiencies and toxicities in plants. In: Handbook of Nutrition and Food. Chemical Rubber Co. Press.
- FOY, C.D., FLEMING, A.L. and SCHWARTZ, J.W. 1973. Opposite aluminum and manganese tolerance of two wheat varieties. Agronomy J. 65: 123-126.
- FOY, C.D. 1963. Characterization of manganese, aluminum, and hydrogen ion toxicities in alfalfa, Research Report, 365, USDA, ARS, SWC, U.S. Soil Laboratory, Beltsville, Maryland.
- FOLLEY, S.J., and A.L. GREENBAUM 1948. Determination of the arginase activities of homogenates of liver and mammary gland. Effects of pH and substrate concentration and especially of activation of divalent metal ions. Biochem. J. 43: 537-549.
- GENGENBACH, B.G. and GREEN, C.E. 1975. Selection of T-citoplasm

- GERHARDT, B. 1966. Manganeffekte in photosynthetischen Reaktionen von Anarystis Ber. Deut. Bot. Ges. 79: 63-68.
- GERRETSEN, F.C. 1950. Manganese in relation to photosynthesis. II Redox potential of illuminated crude chloroplast suspensions. Plant and Soil 2: 159-193.
- GOLLUB, M. and VENNESLAND 1947. Fixation of carbon dioxide by a plant oxalacetate carboxylase J. Biol. chem. 169: 233-239.
- HABERMAN, H. 1969. Reversal of copper inhibition in chloroplast reactions by manganese. Plant Physiol. 44: 331-336.
- HABERMANN, H.M., M.A. HANDEL, and P. MCKELLAR 1968. Kinetics of chloroplast mediated photooxidation of diketogulonate. Photochem Photobiol 7: 211-224.
- HEENAN, D.P., CARTER, O.G. 1976. Tolerance of soybean cultivars to manganese toxicity. Crop. Sci. 16: 389-91.
- HEIMER, Y.M. and FILNER, P. 1970. Regulation of the nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells II. Properties of a variant cell line. Biochem. Biophys. Acta 215: 152-165.
- HEINTZE, J.G.C. 1968. Manganese phosphate reaction in aqueous systems and the effects of application of monocalcium phosphate on the availability of manganese to oats in alkaline fan soil: Plant Soil. 24: 407-23.
- HELGENSON, J.P., HABERLACH, G.T. and UPPER, C.D. 1976. A dominant gene conferring resistance to tobacco plants is expressed in tissue cultures. Phytopathology, 66: 91-96.
- HEWITTI, E.J. 1948. The resolution of the factors in soil acidity IV. The relative effects of aluminum and manganese toxicities in some farm and market garden crops. Long Ashton Res. Sta. Ann.

- HOFNER, W. 1970. Elsen und manganhaltige Verbindungen in blutungssaft von Helianthus annuus. *Physiol. Plant* 23: 673-77.
- HOMANN, P. 1967. Studies on the manganese of the chloroplast. *Plant Physiol.* 42: 997-1007.
- HOPKINS, E.F. 1930. The necessity and function of manganese in the growth of Chlorella sp. *Science*, 72: 609-10.
- JACKSON, W.A. 1967. Physiology of the uptake of ions by the growing plant cell. In: I.H. Ronson et al (ed.). *Ecological aspects of the mineral nutrition of plants*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, *Bs. Ecol. Sco. Symp.* 9: 261-279.
- JUANG, T.C. 1973. Nutrients balance involving zinc, Iron and manganese in sugar cane. *Soil Fert. Taiwan* k: 25-34.
- KANNAN, S. 1969. Factors related to iron absorption by enzymically isolated leaf cells. *Plant Physiol.* 44: 1457-1460.
- KESSLER, E. 1955. On the role of manganese in the oxygen-evolving system of photosynthesis. *Arch. Biochem Biophys* 59: 527-529.
- LEE, C.R. 1972. Inter-relationships of aluminum and manganese on the potato plant. *Agron. J.* 64: 546-549.
- LEVINE, R.P. 1962. *Genética Biblioteca Pioneira de Biologia Moderna* pp 235.
- LEWIN, J. and REINANN, B.E.F. 1969. Silicon and Plant growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20: 289-304.
- LINDSAY, W.L. 1972. *Inorganic Phase Equilibria of Micronutrients in soils in Micronutrients in Agriculture*. Mortvedt, J.J., Giordano, P. M. and Lindsay, W.L. (ed.) SSSA.
- MALAVOLTA, E. 1980. *Elementos de Nutrição Mineral de Plantas*. Ed. Agronomica. CERES Ltda. 251 pp.

- MALIGA, P. 1978. Resistance mutants and their use in Genetic manipulation. p. 381-392. In: Frontiers of plant tissue culture. T.A. Thorpe (ed.) Univers. Calgary, Can.
- MASS, E.V., D.P. MOORE and B.J. MASON. 1969. Influence of Calcium and magnesium on manganese absorption. Plant Physiol. 44: 796-800.
- McKENNA, J.M., and N.I. BISHOP 1967. Studies on the photooxidation of manganese by isolated chloroplasts. Biochem. Biophys. Acta 131: 339-349.
- MELCHERS, G. and BERGMANN, 1959. Ber. Detsch. Bot. Ges. 71: 459-473.
- MEREDITH, C.P. 1978. Selection and characterization of Aluminum-resistant variants from tomato cell cultures. Plant. Sci. Letters. 12: 25-34.
- MEUDT, W.J. 1971. Interactions of sulfite and manganese ion with peroxidase oxidation products of indole-3-acetic acid. Phytochemistry 10: 2103-2109.
- MORGAN, P.W., TAYLOR, D.M., JOHNSON, H.E. 1966. Manipulations of IAA oxidase activity and auxin deficiency symptoms in intact cotton plants with manganese nutrition. Physiol. Plant. 37: 149-156.
- MOZÉ, P. 1936. The role of special elements (boron, copper, zinc, manganese, etc) in plant nutrition. Annu. Rev. Biochem. 5: 525-538.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- NABORS, M.W., DANIELS, A., NADOLNY, L. and BROWN, C. 1975. Sodium chloride tolerant lines of tobacco cells. Plant. Sci. Letters

- corn seedlings by the addition of tryptophan. *Crop. Sci. Plant. Anal.* 7: 547-57.
- SANGUPTA, C. 1978. Protein and Nucleic acid metabolism during somatic Embryogenesis in Carrot a Dissertation. Tese de PhD, apresentada a Universidade de Ohio, Columbus, USA.
- SHERWIN, J.E., and W.K. PURNES 1969. Tryptophan as an auxin precursor in cucumber seedlings. *Plant Physiol.* 44: 1303-1309.
- SHUMAN, L.M., ANDERSON, O.E. 1976. Interactions of manganese with other ions in wheat and soybeans, *Commun. Soil Sci. Plant. Anal.* 7: 547-57.
- SOMERS, I.I. and SHIVE, J.W. 1942. The iron-manganese relation in plant metabolism. *Plant. Physiol.* 17: 582-602.
- SUNDAHL, M.R. 1978. Cell culture of Coffea spp. And its applications in Research. PhD. Dissertation. The Ohio State University Columbus Ohio. USA.
- SOUTO, S.M., DOBEREINER, J. 1971. Manganese toxicity in tropical forage legumes. *Pesq. Agrop. Bras.* 4: 128-38.
- SPECK, J.F. 1949. The effect of cations on the decarboxylation of oxalacetic acid. *J. Biol. Chem.* 178: 315-324.
- SPENCER, D., and J.V. POSSINGHAM 1961. The effect of manganese deficiencies on photophosphorylation and the oxygen evolving-sequence in spinach chloroplasts *Biochem. Biophys. Acta* 52: 379-381.
- STEVENSON, F.J. and ARDAKANI, M.S. 1972. Organic Matter Reactions Involving Micronutrients in Soils. p. 79-114. In: Mortvedt, J.J., GIORDANO, P.M. and LINDSAY, W.L. *Micronutrients in Agriculture S. S.A.*

- STEWART, F.C., MAPES, M.O., and SMITH, J. 1958. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *Ann. J. Botany*, 45: 693-703.
- STONIER, T., RODRIGUEZ-TORMES, F. & YONEDA, Y. 1968. Studies on auxin protectors. IV. The effects of manganese on auxin protector I of the Japanese Morning Glory. *Plant. Physiol.* 43:69-72.
- SUNDERLAND, N. 1977. Nuclear cytology, in *Plant tissue and cell culture*. H.E. STREET (ed.). Blackweel. pp. 177-205.
- SUTCLEFFE, J.F. 1962. *Mineral Sults Absorption in Plants*. New York. Pergamon McMILLAN.
- SYLVAIN, P.G. 1954. Long-range objectives in studies of the Physiology of coffee. *Turrialba*, 4 (1): 13-22.
- TEICHLER-ZALLEN, D. 1969. The effect of manganese on chloroplast structure and photosynthetic ability of Chlamydomonas reinhardi *Plant Physiol.* 44: 701-710.
- TIFFIN, L.O. 1967. Translocation of manganese iron, cobalt, and zine in tomato. *Plant Physiol* 42: 1427-1432.
- TOTTINGHAN, W.E. and BECK, A.J. 1916. Antagonism betwen manganese and iron in the growth of wheat. *Plant World*, 19: 359-70.
- TSUI, C. 1948. The role of zinc in auxin synthesis in the tomato plant. *Amer. J. Bot.* 35: 172-179.
- VAN GOOR, B.J., WIERSMA, D. 1974. Redistribution of potassium, calcium, magnesium and manganese in the plant. *Physiol. Plant.* 31: 163-168.
- VAN GOOR, B.J., WIERSMA, D. 1976. Chemical forms of manganese and zinc in phloem exudates. *Physiol. Plant.* 36: 213-216.
- VENNESLAND, B., and R.Z. FELSHER 1946. Oxalacetic and pyruvic

- WAIGOOD, E.R., DAKS, and MACLACHLAN, G.A. 1956. Ont the mechanism of indoleacetic acid oxidation by wheat leaf enzymes. Can. J. Bot. 34: 54-59.
- WAGENKNECHT, A.C. and BURRIS, R.H. 1950. IAA inativating enzymes from bean roots and pea seedlings. Arch. Biochem. Biophy. 25: 30-53.
- WILDMAN, S.G., M.G. FERRI, and J. BONNER. 1947. The enzymatic con_uversion of Tryptophan to auxin by spinach leaves. Arch Biochem 13: 131-144.
- WIDHOLM, J.M. 1976. Selection and characterization of cultured car_orot and tobacco cells resistant to lysine, methionine, and proline analogs. Can. Journal of Bot. 54 (13) 1523-1529.
- WIDHOLM, J.M. 1972 b. Cultured Nicotiana tabacum cells with an altered anthranilate synthetase which isless sensitive to feed back inhibition. Biochem. Biophys. Acta. 261: 52-58.
- WIDHOLM, J.M. 1972. a. Tryptophan biosynthesis in Nicotiana tabacum and Daucus carota cell cultures: site of action of inibitory tryptophan analogs. Bioch. Biophys. Acta 261: 44-51.
- WU, L. and ANTONOVICS, J. 1978. Zinc and copper tolerance of Agrotis stolonifera L. in tissue culture. Amer. J. Bot. 65 (3): 268-271.
- YEOMAN, M.M., and H.E. STREET, 1977. General cytology of cultured cells in Plant Tissue and Cell Culture. H.E.STREET (ed.) Black_uwell pp 137-176.