

CONTROLE DA VITRIFICAÇÃO DO CRAVO (*Dianthus caryophyllus* L.) *IN VITRO*

G.R.F. CUZZUOL¹; L.A. GALLO¹; M. DE ALMEIDA²; O.J. CROCOMO¹

¹ Centro de Biotecnologia Agrícola-CEBTEC/Dept. de Química-ESALQ/USP, CEP: 13418-900, Piracicaba, SP

² Dept. de Botânica - ESALQ/USP, CEP: 13418-900, Piracicaba, SP

RESUMO - Baixos níveis de benziladenina (BAP), baixo potencial de água no meio e baixa umidade condicionada por tampas de algodão foram capazes de inibir a vitrificação de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivado *in vitro*, mas essas condições implicaram no baixo desenvolvimento das plantas e da taxa de propagação. Elevados níveis de NH_4NO_3 demonstraram serem altamente promotores da vitrificação assinalada pelo alto conteúdo de proteína, enquanto relação inversa foi constatada para altos níveis de CaCl_2 , aos quais seguiu-se aumento na atividade da peroxidase. Os resultados permitiram estabelecer um protocolo para controle da vitrificação do cravo, constituído de 4,0 g/l de "Gelrite", 0,5 mg/l de ácido naftalenoacético (ANA), 0,05 mg/l de BAP, doses normais das soluções salinas do meio MS e vedação do tipo tampas de algodão para cultivo de ápices meristemáticos. Para a fase de multiplicação, este protocolo deve ser alterado para 0,5 mg/l de BAP, 10,3 mM de NH_4NO_3 e 12,0 mM de CaCl_2 .
Descritores: cravo, *Dianthus caryophyllus*, vitrificação, meristema, micropropagação

CONTROL OF CARNATION VITRIFICATION (*Dianthus caryophyllus* L.) *IN VITRO*

ABSTRACT: Low levels of benzyl adenine (BAP), low water potential of the growth medium and low humidity due to cotton covers, inhibited vitrification of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. However, under these conditions, a low development of plants and a decrease in the multiplication ratio, were observed. High levels of ammonium nitrate enhanced vitrification with an increase in the total soluble protein content. An inverse correlation was observed in the presence of high levels of calcium chloride. The latter was correlated to an increase in peroxidase activity. The results allowed the establishment of a protocol to control vitrification during carnation meristem growth, as follows: "Gelrite", 4 g/l; naphtalene acetic acid, 0.5 mg/l; BAP, 0.05 mg/l; normal dosis of MS salts; cotton covers. For *in vitro* multiplication the protocol should be altered to BAP, 0.5 mg/l; ammonium nitrate 10.3 mM; calcium chloride 12.0 mM.

Key words: *Dianthus caryophyllus*, meristem, vitrification, carnation, micropropagation

INTRODUÇÃO

Algumas espécies, como o cravo (*Dianthus caryophyllus* L.), quando cultivadas *in vitro* são suscetíveis a uma reação de hipersensibilidade às condições de estresse do meio, desenvolvendo variações anormais como a vitrificação assinalada por desordens fisiológicas generalizadas (ZIV, 1991).

Plantas vitrificadas são caracterizadas por apresentarem baixos níveis de lignina e celulose (KEVERS *et al.*, 1984; 1987); baixa resistência de parede celular (KEVERS & GASPARG, 1986); hipertrofia celular (VIEITEZ *et al.*, 1985); folhas entumescidas e quebradiças (DEBERGH, 1983; LESEHEM *et al.*, 1988a,b; ZIV *et al.*, 1987) e

reduzida taxa de sobrevivência em condições autotróficas (SUTTER & LANGHANS, 1979).

A vitrificação é uma das principais anomalias que tem recebido atenção especial nos últimos anos, tendo sido observada a interação simultânea de diversos fatores, interferindo nas principais vias metabólicas como fotossíntese, respiração e transpiração (ZIV, 1991). Uma relação entre a vitrificação e a atividade de determinadas enzimas foi diagnosticada (PHAN & LETOUZÉ, 1986). Em material vitrificado observa-se diminuição na atividade das enzimas peroxidase e CoA-ligase em relação à planta normal.

Os eventuais fatores da vitrificação têm sido atribuídos ao potencial osmótico (DEBERGH *et al.*, 1981; HAKKAART &

VERSLUIJS, 1983; PASQUALETO *et al.*, 1988), concentração dos reguladores de crescimento, especialmente a citocinina (LESHEM *et al.*, 1988a; 1988b), umidade e a concentração salina do meio de cultura (DAGUIN & LETOUZÉ, 1986). Para contribuir ao estudo dessa questão é que foi conduzido o presente trabalho tendo em vista determinar as condições controladoras da vitrificação do cravo *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Efeito de benziladenina (BAP) - Ápices meristemáticos de cravo medindo aproximadamente 0,3 mm (1 ou 2 pares de primórdios foliares) foram inoculados em meio de MURASHIGE & SKOOG, (1962) (meio MS), 8 g/l de ágar; 30 g/l de sacarose com pH ajustado a 5,5 e incubado em sala de crescimento com intensidade luminosa de 2000 lux, fotoperíodo de 12h e temperatura de 25°C. O meio de cultura básico foi suplementado com seis concentrações de BAP: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/l, tendo 20 repetições por tratamento. Foram avaliadas a frequência de plantas vitrificadas e a performance do desenvolvimento das plantas após 40 dias da inoculação, obedecendo a um critério de notas com valores de 0 a 7 atribuído às características morfológicas. O delineamento foi inteiramente casualizado.

Explantos nodulares medindo 1,5 cm de comprimento oriundos das plantas regeneradas a partir de ápices meristemáticos foram transferidos para meio básico MS acrescentado de BAP em seis concentrações: 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/l, incubados na mesma condição descrita para ápices meristemáticos. As variáveis analisadas foram o número e comprimento de brotações adventícias por explante e a frequência da vitrificação.

Efeito do agente gelificante - Ápices meristemáticos foram inoculados em cinco concentrações do agente gelificante "Gelrite": 2,3; 2,7; 3,2; 3,8 e 4,5 g/l em meio básico de MS suplementado com 0,5 mg/l de ácido naftalenoacético (ANA) mais 0,05 mg/l de BAP. O experimento foi constituído de 10 repetições e o critério de avaliação foi o mesmo adotado para o efeito de BAP. Testaram-se também cinco concentrações de "Gelrite": 2,5; 3,0; 4,0; 6,0 e 9,0 g/l para explantes nodulares em meio de MS

suplementado com 0,5 mg/l de BAP, com 10 repetições por tratamento. Foram avaliados o número e comprimento de brotações adventícias por explante e a frequência de plantas vitrificadas.

Efeito do sistema de vedação - Este experimento em fatorial do tipo 2 x 2, constituiu-se de duas concentrações de ágar: 8 e 12 g/l combinadas com dois tipos de vedação dos frascos: papel alumínio e tampas de algodão para regeneração de ápices meristemáticos. O meio básico foi suplementado com 0,5 mg/l de ANA e 0,05 mg/l de BAP, com 10 repetições por tratamento. O critério de avaliação foi o mesmo adotado para o efeito de BAP. Para os explantes nodulares testaram-se os dois tipos de vedação já citados combinados com 11 g/l de ágar e 4,5 g/l de "Gelrite". O meio básico foi suplementado com 0,5 mg/l de BAP, 10,3 mM de NH_4NO_3 e 12,0 mM de CaCl_2 . As variáveis analisadas foram o número e comprimento de brotações adventícias por explante e a frequência da vitrificação.

Determinação do potencial de água - Adotou-se o método da higrometria de par termoeletrico, pelo uso de câmaras de amostras modelo C-52 e microvoltímetro higrométrico modelo HR-33, da Wescar Inc. As medidas foram realizadas após um tempo mínimo de 2 horas de equilíbrio das amostras nas câmaras. Mediu-se o potencial de água do meio básico tendo como agente solidificante "Gelrite" nas concentrações de 2,5; 3,0; 4,0; 6,0 e 9,0 g/l e da folha e região nodal de plantas normais e vitrificadas.

Análise histológica - O material foi cortado à mão livre, desidratado em série alcoólica, corado com vermelho congo e verde iodo (SASS, 1951) e montado em lâminas histológicas semi permanentes.

Níveis de NH_4NO_3 e CaCl_2 na taxa de vitrificação - Explantes da região nodal medindo aproximadamente 1,5 cm de comprimento de plantas de cravo mantidas *in vitro* por um ano foram transferidos para meio básico semi-sólido de MS constituído de quatro concentrações de NH_4NO_3 : 0,0; 20,6; 61,8 e 130,0 mM e quatro concentrações de CaCl_2 : 0,0; 3,0; 9,0 e 15,0 mM suplementado com 0,5 mg/l de BAP e 4,2 g/l de "Gelrite". Cada tratamento constou de 10 repetições, condicionadas

em frascos vedados com tampas de algodão. A variável analisada foi a frequência de plantas vitrificadas após 30 dias de cultivo.

Determinação de proteína total solúvel - Para o material vegetal obtido dos tratamentos de diferentes níveis de fontes nitrogenadas e de cálcio na vitrificação, determinou-se o teor de proteína total solúvel (LOWRY et al., 1951) aos 30 dias após a inoculação.

Atividade de peroxidase - Extratos de plantas submetidas a vários níveis de fontes nitrogenadas e de cálcio foram obtidos utilizando tampão fosfato de sódio, pH 6,1 a 0,1 M na proporção 1:5. A mistura reativa se constituiu de 0,25 ml de água oxigenada 0,1 M; 0,5 ml de pirogalol 0,02 M como doador de hidrogênio; 1,0 ml de extrato diluído em 1:40; o volume foi completado a 3 ml com solução tampão. O controle foi formado por todos os reagentes com exceção da água oxigenada. A análise foi realizada de acordo com FERHRMANN & DIMON (1967), lendo-se a 470 nm no espectrofotômetro U-3210 da Hitachi após 10 min da adição da água oxigenada a 25°C. A atividade da peroxidase foi expressa em 470/min por g/PMF.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de BAP - É ampla a aplicação de citocininas na micropropagação, sendo associado os altos níveis de BAP à morfogênese anormal (ZIV, 1991). No entanto, os resultados demonstraram que mesmo baixos níveis de BAP promoveram alto índice de vitrificação. A partir da mais baixa concentração

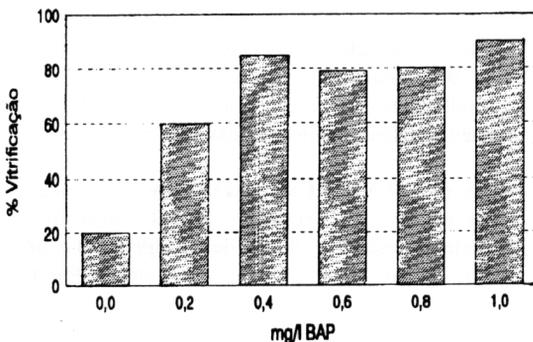


Figura 1 - Efeito de BAP no controle da vitrificação de ápices meristemáticos de *D. caryophyllus* in vitro aos 40 dias da inoculação.

de BAP, 60% e 50% das plantas desenvolveram a vitrificação para a regeneração de ápices meristemáticos e multiplicação a partir de nódulos caulinares, respectivamente, aumentando essa taxa progressivamente com o aumento da concentração de BAP (Figuras 1 e 2). Mesmo no controle desenvolveram-se plantas vitrificadas, embora com baixa frequência (20%), sugerindo que outros fatores além do regulador BAP, estejam envolvidos na morfogênese anormal.

Por outro lado, doses elevadas de BAP garantiram rápido desenvolvimento e maior taxa de multiplicação de gemas. Todavia, no cultivo de ápices meristemáticos, somente o controle diferiu dos demais tratamentos. Embora baixos níveis de

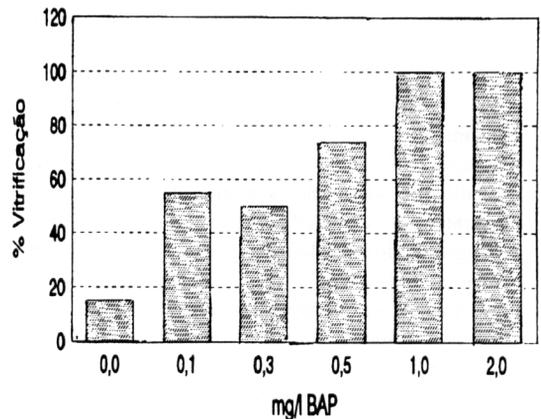


Figura 2 - Efeito de BAP no controle da vitrificação da fase de multiplicação de *D. caryophyllus* in vitro aos 40 dias da inoculação.

BAP tenham contribuído também para a redução da vitrificação durante a fase de multiplicação, ainda que fracamente, observou-se que as doses maiores ofereceram melhor taxa de perfilhamento com 16,5 brotações para a dose de 2,0 mg/l de BAP e 1,35 brotações para o controle (Figura 3). No entanto às taxas de perfilhamento seguiu-se redução no comprimento das brotações.

O mecanismo de ação da citocinina no processo da vitrificação é pouco compreendido. Talvez ela induza uma súbita atividade celular (BORNMAN & VOGELMANN, 1984; KATAEVA et al., 1991; WILLIAMS & RAJI, 1991) e em um meio com alto potencial hídrico e/ou uma atmosfera de elevada umidade relativa no interior dos frascos, resultaria em novas células que logo se turgiriam. Certos autores como GASPAR et al. (1984) citam ainda a possibilidade dos reguladores provocarem

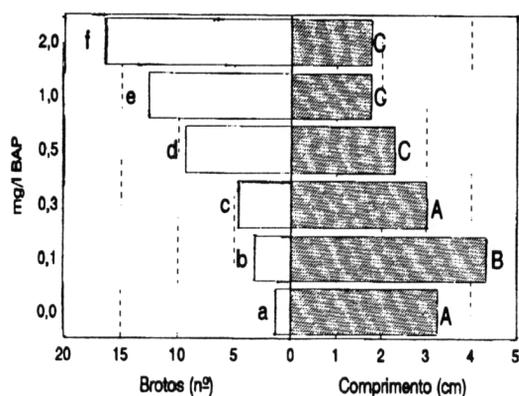


Figura 3 - Efeito de BAP na fase de multiplicação de *D. caryophyllus* *in vitro* aos 40 dias da inoculação.

um estresse com o posterior desencadeamento da síntese de etileno. Este último seria o responsável pelas alterações observadas na morfogênese anormal ao nível de parede celular.

Efeito de agente gelificante - Com o aumento da concentração do agente gelificante foi verificado uma sensível redução na vitrificação, embora resultando numa menor taxa de multiplicação e

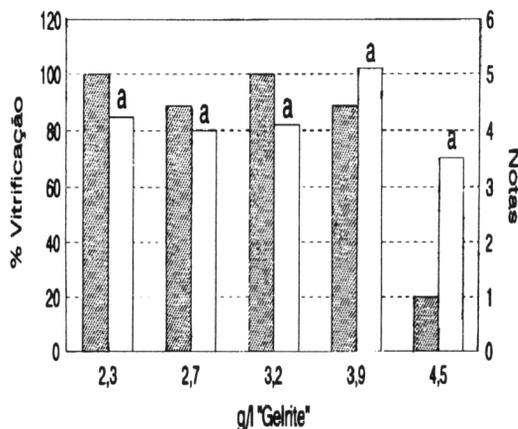


Figura 4 - Efeito de "Gelrite" no controle da vitrificação e do desenvolvimento de ápices meristemáticos de *D. caryophyllus* *in vitro* aos 40 dias da inoculação. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P < .05\%$).

baixo desenvolvimento. Para o cultivo de ápices meristemáticos somente a concentração de 4,5g/l de "Gelrite" foi eficiente no controle da vitrificação

sem afetar o desenvolvimento das plantas (Figura 4). Verificou-se na fase de multiplicação, uma relação proporcional entre nível de "Gelrite" e índice de vitrificação (Figura 5) que decaiu de 80% na menor concentração testada de 2,5 g/l para 8,4% na maior concentração de 9,0 g/l. Por outro lado, maiores concentrações de "Gelrite" comprometeram a taxa de multiplicação e comprimento das brotações onde a dose de 2,5 g/l de "Gelrite" proporcionou melhor taxa de propagação com 10,2 gemas por explante (Figura 6) porém com 80% de vitrificação, enquanto na dose de 9,0 g/l essa taxa decaiu para 4,2 gemas por explante, contudo com menor índice de vitrificação (8,4%).

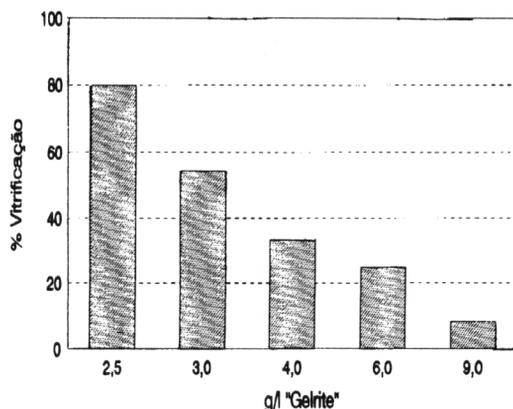


Figura 5 - Efeito de "Gelrite" no controle da vitrificação da fase de multiplicação de *D. caryophyllus* *in vitro* aos 40 dias da inoculação.

Resultados similares foram obtidos por PASQUALETO *et al.*, (1988) no controle da vitrificação elevando a concentração de "Gelrite" para 6,0 g/l; e por DEBERGH *et al.* 1981), ZIV *et al.* (1983) e CHOUDHARY (1991) aumentando a concentração de ágar para 11 g/l, porém a esse tratamento seguiu-se também considerável redução na taxa de propagação e no comprimento das brotações. Esses resultados podem ser atribuídos à condição de baixo potencial de água (ψ) que afeta a disponibilidade de água e substâncias do meio de cultivo, dentre elas a citocinina (DEBERGH, 1983 e DEBERGH *et al.*, 1981) que demonstrou ser potente estimulante da vitrificação nas condições do experimento.

As medições do potencial de água do meio básico nas variadas concentrações de "Gelrite" durante a multiplicação e em explantes

foliares e caulinares de plantas normais e vitrificadas são apresentadas na Tabela 1. Nota-se uma diminuição do (σ) em relação ao aumento da concentração do "Gelrite" obedecendo uma relação inversamente proporcional. A Tabela 1 mostra também que plantas vitrificadas apresentaram maior conteúdo de água em relação às plantas normais. Os valores do (σ) nas folhas e caules foram maiores nas plantas vitrificadas. Segundo KEVERS & GASPAR (1985a,b), plantas vitrificadas são caracterizadas por desenvolverem baixa resistência de parede, permitindo intensa entrada de água a partir do meio com elevado (σ), gerando células

hiper-hídricas. Nessas condições os meios de cultura com mais elevados potenciais de água estimularam maior índice de vitrificação.

Efeito de sistemas de vedação - Praticamente todos os tratamentos que acarretam redução da unidade contribuem para a redução da vitrificação (KATAEVA *et al.*, 1991; RITCHIE *et al.*, 1991). As combinações "tipos de vedação" e "nível de ágar" contribuíram satisfatoriamente na redução da vitrificação. Na regeneração de ápices meristemáticos, vedação com tampas de algodão reduziu a frequência da vitrificação em ambas as

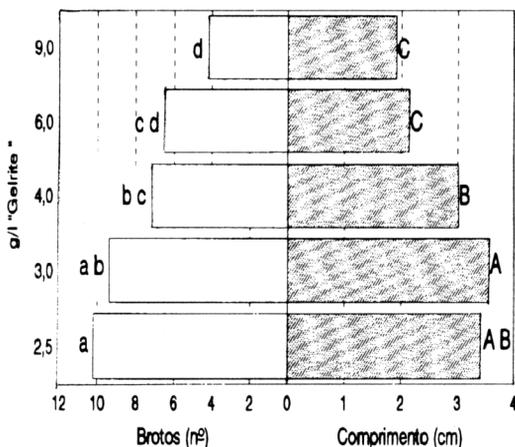


Figura 6 - Efeito de "Gelrite" na fase de multiplicação da micropropagação de *D. caryophyllus* *in vitro* aos 40 dias da inoculação. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P < .05%).

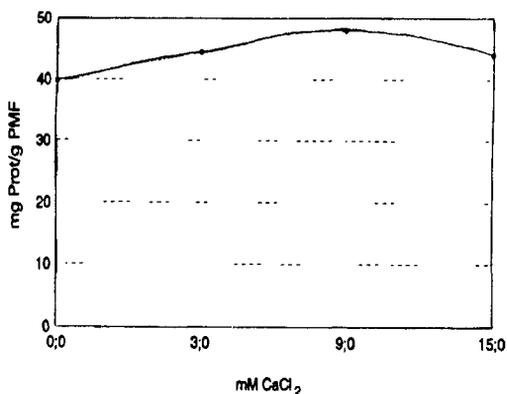


Figura 8B - Efeito do CaCl₂ no nível de proteínas de *D. caryophyllus* propagadas *in vitro* aos 30 dias de inoculação.

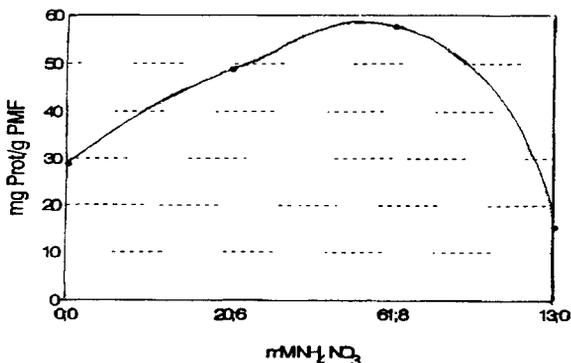


Figura 8A - Efeito do NH₄NO₃ no nível de proteínas de *D. caryophyllus* propagadas *in vitro* aos 30 dias de inoculação.

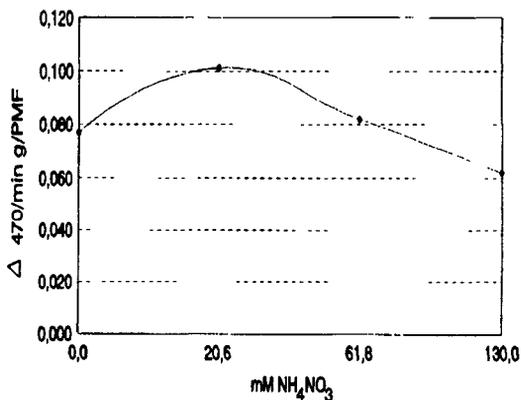


Figura 9A - Efeito do NH₄NO₃ na atividade da enzima peroxidase em plântulas de *D. caryophyllus* cultivadas *in vitro* aos 30 dias da inoculação.

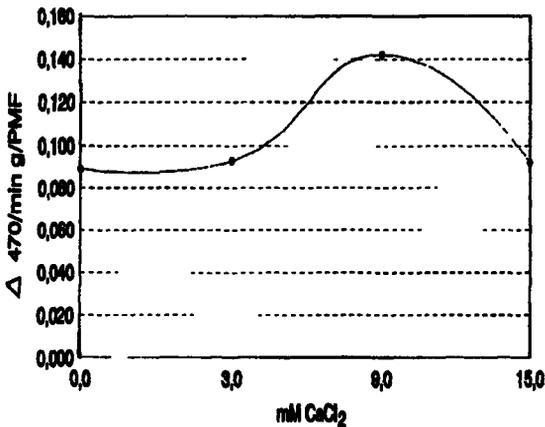


Figura 9B - Efeito do CaCl₂ na atividade de enzima peroxidase em plântulas de *D. caryophyllus* cultivadas *in vitro* aos 30 dias da inoculação.

concentrações de ágar, no entanto, na concentração de 12 g/l de ágar verificou-se menor índice na vitrificação, comprometendo o desenvolvimento (Tabela 2).

O tipo de vedação e o tipo de substância gelificante afetaram a taxa de propagação e o comprimento das brotações. Sob as condições de tampas de algodão, a taxa de propagação foi 40% menor em relação àquelas plantas crescidas sob condição de papel alumínio e o comprimento decaiu 30%. De igual modo, o ágar reduziu a taxa de propagação para 50% em relação ao uso de "Gelrite". HAKKAART & VERSLUIS (1983) também reduziram a vitrificação em cravo a níveis bastante significantes ao substituírem tampas de papel alumínio por tampas de algodão, o que implicou no baixo desenvolvimento das plantas. Esse efeito pode ser atribuído às perdas de água no meio pela evaporação sob condições de baixa umidade restringindo a disponibilidade de água e nutrientes do meio de cultura (DEBERGH *et al.*, 1981).

Embora tenha sido verificado em alguns trabalhos um aumento de etileno em frascos selados, o seu papel na vitrificação é ainda obscuro. Segundo DEBERGH *et al.* (1981), a presença de etileno parece estar relacionada a uma redução na lignificação da parede celular. Assim, o tipo de vedação estaria envolvido na melhor aeração, permitindo a eliminação do etileno para o meio externo e não na redução da umidade interna.

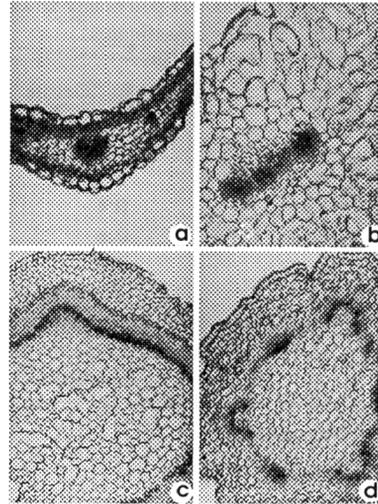


Figura 7 - Corte Transversal de Folha de Material Normal (A) e vitrificado (B), e Caule de Material Normal (C) e vitrificado (D) em aumento 100x.

Estudos anátomo-histológicos - Estudos da anatomia comparativa revelaram sensíveis alterações na organização estrutural do mesófilo e dos tecidos caulinares do material normal e vitrificado como está evidenciado na Figura 7. De imediato percebe-se que a nítida distribuição ordenada, característica dos tecidos parenquimatosos e dos condutores e da epiderme da folha de planta normal (Figura 7A) dá lugar a um padrão morfo genético assinalado pelo alto grau de desorganização do parênquima ao longo do mesófilo, dotado de células volumosas e alongadas, com um acréscimo de grandes espaços intercelulares em folhas de plantas vitrificadas (Figura 7B), causando a impressão de um arranjo paliádico, inexistente em folhas não vitrificadas do cravo. Este arranjo caracteriza uma enorme alteração na relação nucleoplasmática (RNP), evidenciando um maior volume citoplasmático superior ao esperado para este tecido em material normal.

No material em estudo percebe-se também a redução dos tecidos condutores limitados a estreitos feixes vasculares. GERSANI *et al.* (1986) atribuíram a ausência de dominância apical em plantas vitrificadas à redução dos tecidos vasculares por onde se daria, preferencialmente, o transporte de auxinas. Esta baixa capacidade de diferenciação

TABELA 1 - Medidas dos potenciais de água (σ) em diferentes concentrações de "Gelrite" e em explantes foliares e caulinares.

Condição "Gelrite" %	σ (MPa)
0,25	- 0,36
0,3	- 0,42
0,4	- 0,5
0,6	- 0,69
0,9	- 1,5
Folha normal	- 1,7
Folha vitrificada	- 0,75
Caulé normal	- 1,4
Caulé vitrificado	- 0,9

MPa = Megapascal

TABELA 2 - Médias das notas e número de plantas vitrificadas de ápices meristemáticos de cravo, considerando o tipo de vedação e concentrações de ágar.

Tratamentos		R. L. de Plantas	
g/l ágar	Vedação	Notas	Vitrificadas
8	alumínio	3,20 Aa	0,700
8	algodão	4,00 Aa	0,200
12	alumínio	4,00 Aa	0,500
12	algodão	2,00 Bb	0,100
C.V (%)	43,66	R.L. ns	

Letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P < .05$ - maiúsculas e $P < .01$ - minúsculas) de probabilidade. Regressão linear (R.L. ns) não significativa com $P < .01$ %.

TABELA 3 - Médias de plantas vitrificadas durante a multiplicação de gemas de cravo considerando diferentes doses de NH_4NO_3 e CaCl_2 .

Tratamentos (mM)		Vitrificação
NH_4NO_3	0,0	0,1410
	20,6	0,1924
	61,8	0,334
	130,0	0,6325
CaCl_2	0,0	0,4780
	3,0	0,4187
	9,0	0,3081
	15,0	0,0952
		R.L. *

Regressão linear (R.L. *) significativa com $P < .05$ %.

dos tecidos vasculares ainda não está bem esclarecido.

As mesmas alterações observadas em folhas vitrificadas, de igual modo, se aplicam em caules vitrificados, caracterizados histologicamente por células tipicamente volumosas e de contorno irregular no córtex, apresentando grandes espaços intercelulares e tecidos vasculares reduzidos, limitados a pequenos feixes (Figura 7D), enquanto em caule de plantas normais os tecidos vasculares estão em disposição concêntrica e contínua (Figura 7C). Desordens nos tecidos vasculares, clorofilianos e de sustentação são citadas como o efeito mais pronunciado em diversas espécies suscetíveis à vitrificação como *Castanea sativa* (VIEITEZ *et al.*, 1985), *Dianthus caryophyllus* (WERKER & LESHEM, 1987) e maçã. Neste trabalho nenhuma alteração foi encontrada na epiderme caulinar.

Níveis de NH_4NO_3 e CaCl_2 na taxa de vitrificação

- Elevados níveis de amônia provaram ser um forte aliado na promoção da vitrificação em diversas espécies estudadas (ZIV, 1991). Relação inversa foi constatada por GASPAR *et al.* (1984) em meios enriquecidos de cálcio para certas espécies lenhosas. Tais informações corroboram os resultados do presente trabalho no qual a frequência da vitrificação elevou-se progressivamente de acordo com o aumento dos níveis de NH_4NO_3 (Tabela 3).

Da mesma forma ZIV *et al.* (1987) aumentaram a proporção de plantas normais em cultura de crisântemo reduzindo os níveis de nitrato de amônio ou eliminando-o completamente do meio MS. Uma tendência inversa com os tratamentos de cálcio está evidenciado na Tabela 3 onde a dose máxima de 15,0 mM eliminou parcialmente a vitrificação, enquanto a total ausência de CaCl_2 elevou este índice para 50%. Há também a possibilidade de se reduzir a vitrificação aumentando os níveis de cálcio no meio (ZIV, 1991). As análises determinaram ainda, o melhor tratamento no controle da vitrificação como sendo a eliminação total do amônio, onde a vitrificação decaiu de 60% na dose de 130,0 mM para 10% com a eliminação total do amônio. DAGUIN & LETOUZÉ (1987) e LEONHARDT & KANDELER (1987) observaram um aumento na lignificação da parede celular de ameixa e cactus diminuindo o nível de amônio. Para os níveis de cálcio os resultados demonstraram que a dose de 15,0 mM de CaCl_2 pode ser considerada

o melhor tratamento no combate à vitrificação (Tabela 3).

Proteína total solúvel - Ainda que a eliminação total do amônio tenha proporcionado os mais baixos índices de vitrificação (10%), este tratamento afetou o desenvolvimento das plantas devido ao decréscimo do nível de proteína (Figura 8A). Por outro lado para os tratamentos de cálcio, a maior dose testada, que resultou na máxima redução da vitrificação, não afetou drasticamente o desenvolvimento das plantas em função da leve queda do nível de proteína (Figura 8B). Os tratamentos de amônio e de cálcio determinaram um aumento gradual no teor de proteína, no entanto, os níveis alcançados com NH_4NO_3 foram superiores aos de CaCl_2 (Figuras 8A e B).

Análise bioquímicas revelaram que o conteúdo de proteínas em plantas vitrificadas é superior ao das plantas normais (LETOUZÉ & DAGUIN, 1983; PHAN & LETOUZÉ, 1983; ZIV *et al.*, 1983). LETOUZÉ & DAGUIN (1983), VIETH *et al.* (1983) e KEVERS *et al.* (1984) sugerem que a alta concentração de amônio pode levar a um aumento na taxa C/N devido a maior atividade das vias biossintéticas de aminoácidos, ocasionando uma queda na atividade da via das pentoses, fonte de componentes estruturais da parede celular como a lignina e a celulose.

Confirmando essas observações tem-se constatado uma relação entre aumento da vitrificação e atividade da glutamato desidrogenase, ocasionada pelas elevadas concentrações amoniacais do meio (DAGUIN & LETOUZÉ, 1987). Embora o cálcio tenha estimulado também a síntese de proteína ainda que em níveis sempre inferiores aos tratamentos de amônio, salvo a última dose, esse aumento de proteína nos tratamentos com cálcio não foi acompanhado pelo aumento da vitrificação como foi observado para os tratamentos com amônio.

Esse comportamento está ligado ao fato de que o cálcio age como cofator da peroxidase, enzima chave do metabolismo da parede celular, que promove ligações entre seus polímeros dando firmeza e limitando o alongamento da parede celular por ocasião da entrada da água no citoplasma celular. Desse modo, o aumento da síntese de proteína nos tratamentos de cálcio não foi seguido pela vitrificação, pois os altos níveis de cálcio compensariam, atuando diretamente no

metabolismo da parede celular, impedindo a baixa resistência da parede característica de células de material vitrificado.

Atividade da peroxidase - Enquanto doses crescentes de amônio revelaram-se inibitórias na atividade da peroxidase (Figura 8A), efeito inverso foi notado para as doses de cálcio, salvo a última dose onde se observou uma pronunciada queda na atividade desta enzima (Figura 8B). De acordo com DAVIES (1990), a peroxidase age realizando ligações do tipo isoditrosil entre proteínas de parede, e do tipo difurilato entre polissacarídeos de parede, restringindo a plasticidade da parede celular. Portanto, tratamentos estimuladores da atividade de peroxidase podem controlar a vitrificação como constatado no presente trabalho. Além de estimular a atividade da peroxidase, o cálcio pode se acumular na lamela média na forma de pectato de cálcio e promover ligações entre as microfibrilas da parede celular através de pontes de cálcio, limitando a extensibilidade da parede. Por isso, não se observou um aumento na taxa de vitrificação à maior dose de CaCl_2 por ocasião da queda da atividade da peroxidase nesta última dose.

Esperava-se que a cinética enzimática fosse linear ao longo dos tratamentos, porém, para a maior dose de cálcio onde 90% das plantas desenvolveram-se sem vitrificação, ocorreu uma sensível queda na atividade da peroxidase.

De acordo com MALAVOLTA (1980), elevados níveis de cálcio podem inibir a absorção de outros íons como o magnésio numa relação antagônica. Por excelência, o magnésio é considerado um importante cofator enzimático de expressiva participação nas vias metabólicas primárias cruciais do desenvolvimento vegetal como a glicólise, Ciclo de Krebs e a vida das pentoses. Assim, a maior dose de cálcio poderia ter inibido a absorção do Mg e o déficit desse elemento ter reduzido a atividade do Ciclo de Krebs que além de ser fonte de energia, tem ainda a função de fornecer precursores para a biossíntese de proteínas, incluindo aí, a peroxidase. Mesmo assim a baixa atividade da peroxidase na dose de 15,0 mM de CaCl_2 não promoveu a vitrificação, uma vez que o elevado nível de cálcio, possivelmente continuou contribuindo para a formação de pectato de cálcio na lamela média e ligações entre as microfibrilas da parede através de pontes de cálcio, limitando a extensibilidade da parede celular.

Se bem que o possível déficit de Mg na maior dose de cálcio pudesse afetar a biossíntese de proteínas, maior dreno da glicose-6-P poderia ser direcionado, preferencialmente à via das pentoses, para a biossíntese de precursores de celulose e lignina. Segundo KEVERS *et al.* (1984) e VIEITEZ *et al.* (1985), o baixo nível de celulose e lignina são as maiores causas da vitrificação. Nas doses elevadas de amônio, a baixa atividade da peroxidase pode ser atribuída à retro-inibição da síntese proteica e conseqüentemente da peroxidase. Mesmo que este efeito favoreça maior atividade da via das pentoses, a baixa atividade da peroxidase constatada seria ineficiente para realizar as ligações das microfibrilas disponíveis.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas condições deste trabalho, permitem concluir que os baixos níveis do regulador BAP, gel do tipo ágar, baixa umidade nos frascos e baixos potenciais de água podem reduzir consideravelmente a vitrificação, comprometendo, entretanto, a taxa de propagação e crescimento das plântulas. Fatores nutricionais como baixos níveis amoniacal e elevados níveis de cálcio, demonstraram ser inibitórios da vitrificação. As alterações celulares observadas parecem estar sob ação direta da peroxidase e tratamentos que estimulam a sua atividade deve contornar o problema.

Deste modo, os resultados permitiram estabelecer um protocolo para a micropropagação do cravo, para controle da vitrificação, constituído de 4,5 g/l de "Gelrite" ou 8 g/l de ágar, 0,5 mg/l de ANA, 0,05 mg/l de BAP, doses normais das soluções salinas do meio MS e vedação do tipo tampas de algodão para cultura de ápices meristemáticos. Para a fase de multiplicação, este protocolo deve ser alterado para 0,5 mg/l de BAP, 10,3 mM de CaNH_4NO_3 e 12 mM de CaCl_2 do meio básico de MS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORNMAN, C.H. & VOGELMANN, T. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine - induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abis*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.61, p.505-512, 1984.

- CHOU DHARY, M.L. Vegetative propagation of carnation *in vitro* through multiple shoot development. *Indian Journal of Horticulture*, Bangalore, v.48, p.177-181, 1991.
- DAGUIN, F. & LETOUZÉ, R. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.66, p.94-98, 1986.
- DAGUIN, F. & LETOUZÉ, R. Vitreous plants *in vitro*: relationship with ammonium content of the nutrient medium. *Acta Horticulturae*, The Hague, v.212, p.259-261, 1987.
- DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: ed. *Plant hormones and their role in plant growth and development*. New York: Kluwer Academic, 1990. p.1-11.
- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.59, p.270-276, 1983.
- DEBERGH, P.C.; HARBAOURI, Y.; LEMEUR, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.53, p.181-187, 1981.
- FERHRMANN, H.; DIMOND, A.E. Peroxidase activity and phytophthora resistance in different organs of the potato plant. *Phytopathology*, Lancaster, v.57, p.69-72, 1967.
- GERSANI, M.; LESHEM, B.; SACHS, T. Impaired polarity in abnormal plant development. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, v.123, p.91-95, 1986.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PASQUES M.; BOXUS, P. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONG, J.M. & DURZAN, D.J., ed. *Cell and tissue culture in forestry*. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1984. v.1, p. 152-166
- HAKKAART, F.A.; VERSLUJIS, J.A.A. Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. *Netherlands Journal of Pathology*, Wageningen, v.89, p.47-53, 1983.
- KATAEVA, N.V.; ALEXANDROVA, I.G.; BUTENKO, R.G.; DRAGAVTCEVA, E.F. Effect of applied an internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.27, n.2, p.149-154, 1991.
- KEVERS, C. & GASPAR, T. Soluble, membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase, and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured *in vitro*. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, v.118, p.41-48, 1985a.
- KEVERS, C. & GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.4, p.215-223, 1985b.
- KEVERS, C. & GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. *Physiologie Végétale*, Paris, v.24, n.6, p.647-653, 1986.
- KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLÉS, F.; GASPAR, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.61, p.69-74, 1984.
- KEVERS, C.; PRAT, R.; GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in cell wall mechanical properties, cellulose and lignin content. *Plant Growth Regulation*, The Hage, v.5, p.59-66, 1987.
- LEONHARDT, W. & KANDELER, R. Ethylene accumulation in culture vessels - a reason for vitrification? *Acta Horticulturae*, The Hague, v.212, p.223-239, 1987.
- LESHEM, B.; SHALEV, D.P.; IZHAR, S. Cytokinin as an inducer of vitrification in melon. *Annals of Botany*, London, v.61, p.255-260, 1988a.
- LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany*, London, v.62, p.271-276, 1988b.
- LETOUZÉ, R. & DAGUIN, F. Manifestation spontanée et aléatoire d'une croissance anormale en culture *in vitro*. Recherche de marqueurs métaboliques. *Revue Canadienne Biologie Experimentale*, Montreal, v.42, p.23-28, 1983.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FAR, A.A.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, Colchester, v.193, p.265-275, 1951.
- MALAVOLTA, E. *Elementos de nutrição mineral de plantas*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251p.

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PASQUALETO, P.L.; ZIMMERMANN, R.H.; FORDHAM, I. The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell and Organ Culture*, The Hague, v.14, p.31-40, 1988.
- PHAN, C.T. & LETOUZÉ, R. A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents and of hydroxycinnamate: Coa ligase activity of normal and vitreous plants (*Prunus avium* L.) obtained *in vitro*. *Plant Science Letters*, Limerick, v.31, p.323-327, 1983.
- RITCHIE, G.A.; SHORT, K.C.; DAVEY, M.R. *In vitro* acclimatization of chrysanthemum and sugar beet plantlets by treatment with paclobutrazol and exposure to reduced humidity. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.42, n.245, p.157-163, 1991.
- SASS, J.E. *Botanical microtechnique*. 2.ed. Ames: Iowa State College Press, 1951. 228p.
- SUTTER, E.G.; LANNGHANS, R.W. Epicuticular formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, St. Joseph, v.104, n.4, p.493-496, 1979.
- VIEITEZ, A.M.; BALLESTER, A.L.; SAN-JOSÉ, M.C.; VIEITEZ, E. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.65, p.177-184, 1985.
- VIETH, J.; MORISSET, C.; LAMAND, M. Histologie de plantules vitreuses de *Pyrus malus* cv. M-26 et de *Pelargonium peltatum* cv. Chester Frank, tissues de la culture *in vitro* (Etudes préliminaires). *Revue Canadienne Biologie Experimentale*, Montreal, v.42, p.29-32, 1983.
- WERKER, E.; LESHEM, B. Structural changes during vitrification of carnation plantlets. *Annals of Botany*, London, v.59, p.377-385, 1987.
- WILLIAMS, R.R. & RAJI, A.M. Effect of temperature, gel concentration and cytokinins on vitrification of *Olearia microdisca* (J.M. black) *in vitro* shoot cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.26, n.1, p.1-6, 1991.
- ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMANN, R.H., ed. *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991 cap. 4, p.45-69.
- ZIV, M. MEIR, G. & HALEVY, A.H. Factors influencing the production or hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.2, n.1, p.55-60, 1983.
- ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant Science*, Lucknow, v.52, p.127-134, 1987.

Recebido para publicação em 21.06.94

Aceito para publicação em 10.10.95