
RELAÇÃO ENTRE CÁLCIO E TEMPERATURA EM EXPLANTES DE *Eucalyptus grandis* *IN VITRO*

LIMA, Ângela Simone Freitag¹
CANTARELLI, Marília Machado Crestana¹
GONÇALVES, Antônio Natal¹

Recebido em: 2015.05.13

Aprovado em: 2016.04.26

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.1482

RESUMO: Este trabalho visa avaliar a influencia de diferentes concentrações de cálcio na Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de brotações de eucalipto Hill (ex Maiden) submetidas a diferentes temperaturas *in vitro*. O experimento consistiu em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos sendo estes: T0 (sem adição de Ca); T1 (Adição de 2,5 mmol de Ca); T2 (Adição de 5,0 mmol de Ca) e T3 (Adição 10,0 mmol de Ca). Três repetições e quatro explantes por repetição. Foram avaliados os teores de Ca para verificar o efeito do choque térmico sobre a TCR. Não foi possível traçar uma linha tênue entre concentrações de Ca e a TCR, relacionadas às variações de temperatura a que os explantes foram submetidos. Os teores de Ca necessários são 5,0 mmol, 2,5 mmol, 10,0 mmol, 2,5 mmol e 5,0 mmol para as temperaturas de 5°C, 15°C, 25°C, 35°C e 45°C, respectivamente.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*. Meio de cultura. Desenvolvimento. Choque térmico.

RELATION SHIP BETWEEN CALCIUM AND TEMPERATURE IN EUCALYPTUS EXPLANTS *IN VITRO*

SUMMARY: This study aims to evaluate the effects of different concentrations of calcium in relative growth rate of shoots of *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) under different temperatures *in vitro*. The experiment consisted of a completely randomized design with four treatments namely: T0 (no added Ca); T1 (2.5 mmol Adding Ca); T2 (5.0 mmol Adding Ca) and T3 (10.0 mmol Adding Ca). Three replications four explants per replicate. We evaluated the Ca to verify the effect of heat shock on the TCR. The results indicated that calcium had influence on the TCR of the plant with respect to temperature variation. Ca levels required are 5.0 mmol, 2.5 mmol, 10.0 mmol, 2.5 mmol and 5.0 mmol for temperatures of 5 ° C, 15 ° C, 25 ° C, 35 ° C and 45 ° C, respectively.

Keywords: *Eucalyptus grandis*. Culture medium. Development. Termal shock.

INTRODUÇÃO

Uma das maneiras de alcançar altas taxas de crescimento em materiais geneticamente superiores e livres de patógenos é a associação das técnicas de propagação *in vitro*, associadas ao estudo da nutrição, relacionando-os com a temperatura. Os avanços dos sistemas de cultivo *in vitro* são necessários e dependem do aprofundamento de conhecimentos nas áreas de fisiologia, bioquímica e biologia molecular relativos à espécie (CORREIA, 2006).

Quando a planta é submetida a fatores de estresse (como por exemplo: deficiência hídrica, alta e baixa temperatura, salinidade ou radiação ultravioleta), receptores específicos percebem primeiramente os sinais vindos do ambiente (XIONG; ZHU, 2002) e, após a ativação, iniciam (ou suprimem) uma cascata de sinalizações para transmitir a informação entre as células e em muitos casos, ativar fatores de transcrição nuclear para induzir a expressão de locais específicos de genes (XIONG;ZHU, 2001).

Além das fosfoproteínas, tanto o cálcio como o ROS (reative oxygen species ou espécies com oxigênio ativo) são importantes moduladores de eventos de tradução de sinais celulares, principalmente em condições de estresse biótico e abiótico (BOWLER; FLUHR, 2000), tais como ataque patogênico,

¹ Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (USP/ESALQ)

deficiência hídrica, choque osmótico, alta e baixa temperatura e alta intensidade luminosa (PASTORI; FOYER, 2002).

O cálcio (Ca) atua no crescimento global e desenvolvimento das plantas, mas, ao contrário do boro (B), suas ações no metabolismo primário são mais pronunciadas. Arruda (2000) verificou, em condições *in vitro*, a ação de concentrações tóxicas e deficientes de Ca em calos de *E. urophylla*, sugerindo que esse nutriente atua de forma positiva sobre mecanismos bioquímicos expressos em caracteres morfológicos e morfogenéticos da espécie.

As funções do Ca estão relacionadas com a capacidade de coordenação, promovendo estabilidade e ligações intermoleculares reversíveis, predominantemente na membrana plasmática e na parede celular (MARSCHNER, 1995). Para Malavolta (1980), quanto maior é a presença de íons potencialmente prejudiciais no meio, mais crucial parece ser o papel do Ca na manutenção da integridade da membrana celular. O Ca é indispensável para as regiões de crescimento (meristemas) onde se processa a divisão mitótica contínua, bem como no desenvolvimento da raiz, atuando nos processos de alongamento celular, desintoxicação dos íons de hidrogênio e divisão celular (EPSTEIN; BLOOM, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Segundo Langer (2000), as concentrações de cálcio influenciaram a produção de massa seca, o número de brotações e a homogeneidade de crescimento das brotações, como também, variaram durante o período de cultivo. As concentrações de cálcio diferenciadas alteraram os teores de nutrientes minerais que variaram em função do período de cultivo; altas concentrações de cálcio não apresentaram sintomas de toxidez enquanto a sua omissão provocou sintomas de deficiências acentuadas nas brotações.

Segundo Trevisan et al. (2011), o efeito da temperatura influi no desenvolvimento das plantas, na absorção e interação dos nutrientes. As alterações morfológicas, que ocorrem em uma planta, após um estresse térmico, podem significar a adaptação ao novo ambiente (SIEBENEICHLER, 1996).

As plantas ao serem submetidas a baixas temperaturas podem acumular substâncias crioprotetoras, tais como di e trissacarídeos, polióis, sorbitol, compostos amônicos quaternários, glicinabetaína, prolina e poliamidas (GUY, 1990).

Desta forma, um dos fatores que mais influencia e determina o rendimento da produtividade *in vitro* é o equilíbrio nutricional do meio de cultura e a sua interação com o material genético ou explante (CORREA, 2006). De acordo com Grossi (1995), na formulação dos meios de cultura, a concentração de um elemento deve ficar entre os limites da deficiência e da toxicidade, o que leva a tona a importância da análise quantitativa e qualitativa da concentração de cada elemento exigido pela planta.

A taxa de crescimento relativo (TCR) reflete o aumento da matéria orgânica seca, em gramas, de uma planta ou de qualquer órgão dessa, num intervalo de tempo, sendo função do tamanho inicial, ou seja, de material pré-existente.

Este trabalho teve como objetivo verificar a influência de diferentes concentrações de cálcio na taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) submetidas a diferentes temperaturas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi conduzido no Laboratório de Fisiologia das Árvores localizado no Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Campus da Universidade de São Paulo (USP), situado no Município de Piracicaba, Estado de São Paulo (Latitude: 22° 42' 30" sul, Longitude: 47° 38' 30" oeste).

O experimento foi um bifatorial em blocos ao acaso, com parcela subdividida no espaço com três repetições. Como parcela principal foi caracterizados quatro doses de cálcio, sendo eles: T1 (sem adição

de Ca); T2 (com adição de 2,5 mmol de Ca); T3 (com adição de 5,0 mmol de Ca); T4 (com adição de 10,0 mmol de Ca) e como subparcela, quatro temperaturas diferentes (5°C, 15°C, 35°C e 45°C).

Foram utilizados explantes de clones de *Eucalyptus grandis* Hill (*ex maiden*), mantidos em sala de crescimento sob foto período de 16/8 horas e PAR (radiância fotossinteticamente ativa) de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fornecida por luz branca fria e temperatura controle de 25°C. O meio de cultura utilizado para propagação *in vitro* foi o JADS (HIGASHI, 1996) com pH de 5,8. Os tratamentos foram acondicionados em câmara de germinação tipo BOD, modelo MA 403 Marconi, pelo período de 8 horas sob temperaturas baixas e 2 horas de altas temperaturas, permanecendo nas câmaras por 35 dias. Antes de os explantes irem para a câmara de crescimento, foram retirados três vidros para pesagem e posterior secagem em estufa para determinação do peso de massa fresca (PMF) e peso de massa seca (PMS).

Após 14 dias, aplicaram-se os testes de temperatura e após 7 dias mais, foram retirados novamente três frascos de cada tratamento para pesagem e posterior determinação de PMS. As avaliações ocorrem aos 0, 21, 28 e 35 dias pós início do choque térmico. Com o PMS foi possível calcular a Taxa de Crescimento relativo (TCR) e avaliar o efeito da temperatura e os teores de Ca no meio de cultura e seu efeito sobre a mesma.

A análise da taxa de crescimento relativo foi definida por meio da equação 01, dada por Hunt (1982).

$$\text{Equação 01: } \text{TCR} = \frac{\ln \text{PMS}_2 - \ln \text{PMS}_1}{T_2 - T_1}$$

Onde: ln = logaritmo neperiano

PMS₂ = produção de matéria seca no período final

PMS₁ = produção de matéria seca no período inicial

T₂ = tempo final

T₁ = tempo inicial

Após as análises, o material foi levado para secagem em estufa de circulação fechada a 60°C até peso constante.

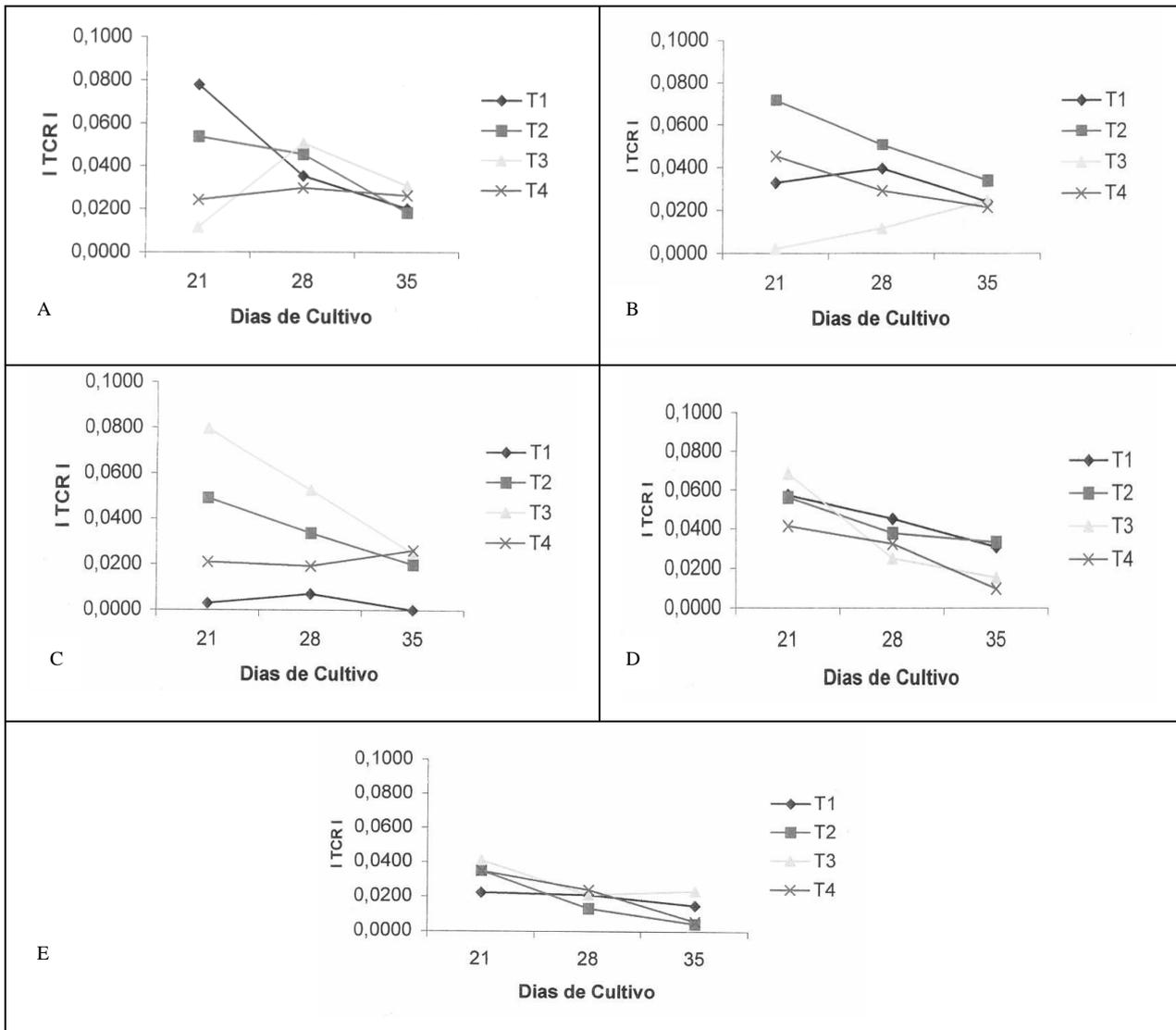
Todos os dados obtidos durante a experimentação foram avaliados pela análise fatorial utilizando técnicas de componentes principais (PCA) e pela comparação de médias de acordo com a Análise de Variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, INC, 1997).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Avaliando a TCR de cada tratamento nas três épocas de avaliação (Figura 01), observou-se que até os vinte e um dias de avaliação, houve um rápido acúmulo de material. Aos vinte e oito dias, o acúmulo na TCR manteve-se mais ou menos constante até os trinta e cinco dias, onde se observou então, um declínio da TCR. Resultados semelhantes foram observados por Rodrigues et al.(1993) em estudos com *Stylosanthes guyanensis* por Briggs et al (1920). Também num estudo clássico realizado por Milthorpe e Moorey (1974), relataram que durante a ontogenia de uma cultura, há um primeiro período com taxa de crescimento acelerada, seguido de outro em que as taxas são mais ou menos constantes e de um terceiro, com declínio neste parâmetro.

FIGURA 01 – Taxa de Crescimento Relativo (TCR) em relação aos três dias de cultivo avaliados para cada tratamento submetidos as temperaturas de 5°C (A), 15°C (B), 25°C (C), 35°C(D) e 45°C (E), respectivamente (*T1 (sem adição de Ca ao); T2 (com adição de 2,5 mmol de Ca); T3 (com adição de 5,0 mmol de Ca); T4 (com adição de 10,0 mmol de Ca))

FIGURE 01 - Relative growth rate (RGR) for the three days of cultivation evaluated for each treatment submitted temperatures of 5 ° C (A), 15 ° C (B), 25 ° C (C), 35 ° C (D) and 45 ° C (E), respectively (* T1 (no addition of Ca), T2 (with addition of 2.5 mmol Ca), T3 (with addition of 5.0 mmol Ca), T4 (with the addition of 10.0 mmol of Ca))



De acordo com a Figura 01-A, ao aplicar um choque térmico de 5°C, pode-se afirmar que o tratamento T1 apresentou maior TCR aos 21 dias, no entanto, apresentou maior perda de crescimento ao longo do experimento. Já os demais tratamentos também apresentaram perdas de crescimento, porém este decréscimo foi menos acentuado. O tratamento T4, com aplicação de 10,0 mmol de Ca, apresentou melhor resposta, ou seja, as altas doses de Ca impediram a redução significativa da TCR ao longo das avaliações.

Ao aplicar um choque térmico com temperatura de 15°C, todos os tratamentos apresentaram queda na TCR, com exceção do tratamento T3, onde as doses de Ca adicionadas ao meio de cultura foram de 5,0 mmol. L⁻¹ (Figura 01-B). Ao contrário das Figuras 1-A e 1-B, ao aplicar um choque térmico de 25°C (Figura 1-C), o tratamento que apresentou uma TCR ascendente foi o tratamento onde aplicou-se 10,0 mmol/L de Ca no meio de cultura.

Nos testes onde foi aplicado choque térmico de 35°C (Figura 1D), os tratamentos com adição de 2,5 mmol de Ca foram os que apresentaram maior TCR em relação aos outros tratamentos. Nesta temperatura, a aplicação de 10,0 mmol de Ca no meio de cultura reduziu o desenvolvimento das brotações de *E. grandis*. Já em temperaturas de 45°C, novamente o tratamento onde aplicou-se 5,0 mmol de Ca apresentou TCR superior aos demais tratamentos.

Com base nessas avaliações foi possível observar a relação entre os teores de Ca disponíveis no meio de cultura e o efeito da temperatura nas brotações de explantes de *E. grandis in vitro*. Em temperaturas variando entre 35 e 45°C, a ausência de Ca no meio de cultura garantiu uma TCR maior em relação aos demais tratamentos. Porém quando os explantes estão submetidos a temperaturas entre 25 e 35°C, quanto maior a temperatura houve um decréscimo na TCR mesmo com adição de cálcio.

De maneira similar aos processos desencadeados por estresse com temperaturas altas, as baixas também podem produzir alterações no metabolismo proteico. Todavia, as respostas a choques frios são diferentes das respostas a altas temperaturas (GIMALOV et al., 1996).

O efeito do estresse térmico sobre a planta ocorre, principalmente, nos estágios vegetativos, pois o crescimento e, principalmente, a expansão celular são dependentes do teor de água na célula. Com a redução da temperatura ambiente, pode ocorrer diminuição do gradiente de potencia hídrico entre o espaço intracelular e a atmosfera ambiente. Isto pode ocasionar redução da absorção de água, pelo sistema radicular e, conseqüentemente, o fechamento dos estômatos, redução da transpiração, redução da taxa fotossintética e redução do crescimento (NOBEL, 1991; SALISBURY e ROSS, 1991).

Assim, a variabilidade dos resultados não permite definir um padrão de comportamento da influência do cálcio, na taxa de crescimento relativo, a não ser, possivelmente, recomendar a utilização de cálcio na fase de crescimento mais avançada, tentando evitar crescimento negativo. Rodrigues (1982), trabalhando com soja em meio nutritivo completo e omissa em cálcio, obteve resultados semelhantes, com grande variação nos resultados de TCR em função do intervalo considerado, notando, no entanto, que ao final do ciclo de desenvolvimento, as plantas carentes em cálcio apresentavam, no mesmo intervalo, valores de TCR menores do que aquelas cultivadas em solução completa.

Na Tabela 01, é apresentada a média da Taxa de Crescimento Relativo (TCR) e desvio padrão para brotações de *E. grandis* Hill (ex Maiden) *in vitro*, submetidos a cinco temperaturas diferentes.

TABELA 01 – Média da Taxa de Crescimento Relativo e desvio padrão para os tratamentos submetidos às temperaturas de 5, 15, 25, 35 e 45°C em brotações de *E. grandis* Hill (ex Maiden) *in vitro*

TABLE 01 - Mean Relative Growth Rate and standard deviation for undergoing treatments at temperatures of 5, 15, 25, 35 and 45 ° C in shoots of *E. grandis* Hill (ex Maiden) *in vitro* **(Continua)**

Tratamentos	Média TCR	Desvio padrão
Temperatura a 5°C		
T1	0,0445	0,0300
T2	0,0392	0,0186
T3	0,0309	0,0195
T4	0,0267	0,0028
Temperatura a 15°C		
T1	0,0322	0,0078
T2	0,0520	0,0188
T3	0,0128	0,0114
T4	0,0320	0,0123

TABELA 01 – Média da Taxa de Crescimento Relativo e desvio padrão para os tratamentos submetidos às temperaturas de 5, 15, 25, 35 e 45°C em brotações de *E. grandis* Hill (ex Maiden) *in vitro*

TABLE 01 - Mean Relative Growth Rate and standard deviation for undergoing treatments at temperatures of 5, 15, 25, 35 and 45 ° C in shoots of *E. grandis* Hill (ex Maiden) *in vitro* **(Conclusão)**

Tratamentos	Média TCR	Desvio padrão
	Temperatura a 25°C	
T1	0,0034	0,0035
T2	0,0343	0,0146
T3	0,0524	0,0273
T4	0,0221	0,0036
	Temperatura a 35°C	
T1	0,0445	0,0132
T2	0,0424	0,0120
T3	0,0363	0,0281
T4	0,0279	0,0163
	Temperatura a 45°C	
T1	0,0194	0,0041
T2	0,0176	0,0158
T3	0,0284	0,0110
T4	0,0215	0,0147

*T1 (sem adição de Ca); T2 (com adição de 2,5 mmol de Ca ; T3 (com adição de 5,0 mmol de Ca T4 (com adição de 10,0 mmol de Ca).

Conforme Slocum e Roux (1983), a planta apresenta incremento no crescimento maior nas idades iniciais de desenvolvimento (período de cultivo), até atingir o ponto de incremento máximo. Após este ponto, ocorre um decréscimo no incremento. Estes resultados corroboram com os apresentados neste trabalho, pois o choque térmico ocorre após 14 dias de cultivo, continuando por mais 21 dias totalizando 35 dias de cultivo, entrando na fase de redução de crescimento.

As TCR sofreram influencia direta das condições do meio de cultura (dinâmica de íons, concentração de nutrientes, estresse hídrico), dos fatores ambientais, das características genéticas e das condições internas das células (LEE et al., 1984; HEPLER e WAYNE, 1985; GOUGLER e EVANS, 1981).

De acordo com Langer (2000), as TCR decaem em todos os tratamentos a partir do 21º dia de cultivo independente da dosagem de Ca adicionada, ao meio. Comparando-se as dosagens de Ca utilizadas tanto neste experimento como em Langer (2000), houve uma diminuição significativa na TCR dos tratamentos submetidos às variações de temperatura, demonstrando que os choques térmicos aplicados levaram a uma redução do crescimento dos explantes.

CONCLUSÃO

Não foi possível traçar uma linha tênue entre concentrações de Ca e às variações de temperatura a que os explantes foram submetidos. Desta forma, a fim de obter dados com alta relação entre os teores de Ca e temperatura, é preciso levar em consideração a temperatura de cada local para determinar as

concentrações mais indicadas. Para a espécie em questão, os teores de Ca necessários são 5,0 mmol, 2,5 mmol, 10,0 mmol, 2,5 mmol e 5,0 mmol para as temperaturas de 5°C, 15°C, 25°C, 35°C e 45°C, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, S. C. C. **Efeito do cálcio na indução de embriogênese somática em *Eucalyptus urophylla***. [Dissertação] - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.
- BOWLER, C.; FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, GB, v.5, n.6, p. 241-246, june 2000.
- BRIGGS, G.E.; KIDD, M.A.; WEST, A.R.C.S. A quantitative analysis of plant growth. **Annales of Applied Biology**, Cambridge, v.7, p.202-223, 1920.
- CORREIA, D. **Macronutrientes, aspectos nutricionais e bioquímicos no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis in vitro***. [Tese] - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Tradução: E. T. Nunes. Londrina: Ed. Planta, 2004. 403 p.
- GIMALOV, F. P.; CHEMERIS, A. V.; VAKHITOV, V. A. Synthesis of cold shock proteins in wheat tribe seedlins of the family Poaceae. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.43, n.228-231, 1996.
- GOUGLER, J.A.; EVANS, M.L. Adaptation of corn roots to exogenously applied auxin. **Physiology Plant**, v. 51, p. 394-398, 1981.
- GUY, C. L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolismo. **Annual Review Plant Physiology Plant Biology**. v. 41, p.m187-223, 1990.
- HEPLER, P.K.; WAYNE, R.O. Calcium and plant development. **Annual Review of Plant Physiology**., v.36, p. 397-439, 1995.
- LANGER, M. **Estudos e análises dos efeitos do cálcio sobre o crescimento inicial do híbrido de *Eucalyptus urophylla x Eucalyptus grandis in vitro***. [Dissertação] - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.
- LEE, J.S.; MULKEY, T.L.; EVANS, M.L. Inhibition of polar calcium movement and gravitropismo in roots treated with auxin-transport inhibitors. **Planta**, v. 160, p. 536- 543, 1984.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 154p.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.
- MILTHORPE, F.L.; MOOREY, J. **An introduction to crop physiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1974. 201p.
- NOBEL, P.S. **Physicochemical and environmental plant physiology**. San Diego: Academic Press, 1991. 635p.

PASTORI, G.M.; FOYER, C.H. Common components, networks, and pathways of crosstolerance to stress. The central role of redox and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, Washington, US, v. 129, n. 2, p.460-468, June 2002.

RODRIGUES, J.D. et al. Influência de diferentes níveis de cálcio em plantas de estíloantes (*Stylosanthes guyanensis* (Aubl) Sw. cv. cook), avaliados através de alguns parâmetros fisiológicos. **Sciencia Agrícola**, Piracicaba, 50(1), p. 47 – 57, fev-mai, 1993.

RODRIGUES, S.D. **Análise de crescimento de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) submetidas à carências nutricionais**. [Dissertação] - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1982.

SALISBURY, F.C.; ROSS, C. **Plant physiology**. 4 ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 682p.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT® user guide: version 6.08. Cary, 1997. v.2.846p.

SIEBENEICHLER, S. C. **Alterações bioquímicas e fisiológicas induzidas por baixas temperaturas em feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L.)**. [Dissertação] – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

SLOCUM, R.D.; ROUX, S.J. Cellular and subcellular localization of calcium in gravistimulated coleoptiles and its possible significance in establishment of tropic curvature. **Planta**, v.157, p. 481-492, 1983.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução: E. R. Santarém et al. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TREVIZAM, R. et al. Morfologia de calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro* sob concentrações de boro e cálcio. **Revista Floresta**, Curitiba, PR, v. 41, n. 3, p. 563-574, jul./set. 2011.

XIONG, L.; ZHU, J.K. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 112, n. 2, p.152-166, June 2001.

XIONG, L.; ZHU, J.K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell and Environment**, Oxford, GB, v. 25, n. 2, p. 131-139, Feb. 2002.