

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
CÁLCIO NA HOMEOSTASE DE BROTAÇÕES DE
Eucalyptus grandis Hill (ex Maiden) SUBMETIDAS A
DIFERENTES TEMPERATURAS *in vitro***

MARÍLIA MACHADO CRESTANA CANTARELLI
Engenheiro Florestal

Orientador: Prof. Dr. **ANTONIO NATAL GONÇALVES**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Recursos Florestais, Área de Concentração: Recursos
Florestais, com opção em Manejo de Florestas de
Produção.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro - 2002

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Cantarelli, Marília Machado Crestana

Influência de diferentes concentrações de cálcio na homeostase de brotações de *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) submetidas a diferentes temperaturas in vitro / Marília Machado Crestana Cantarelli. - - Piracicaba, 2002.

71 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Cálcio 2. Distúrbios fisiológicos de plantas 3. Eucalipto 4. Fisiologia vegetal 5. Propagação vegetal 6. Temperatura I. Título

CDD 634.9734

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

"Cada momento da nossa vida é um ensaio para o que vem a seguir."

Marcio Giúlieme

DEDICO...

Aos meus pais, Paulo e Glycinia, meus irmãos
Márcio e Mariela, por toda paciência,
confiança e amor que têm por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves, pela credibilidade depositada e amizade.

Ao Departamento de Ciências Florestais por todas as ajudas.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos queridos Prof. Dr. João Alexio Scarpari Filho, ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida e Dr. Luis Humberto Gomes pelo grande auxílio.

Ao Prof Dr. Flávio Tavares e toda sua equipe Beto, Keila, Polé, Alessandra, Felipe, Ana, Jupará, Gil, pela colaboração e paciência.

Aos meus grandes amigos em especial: Juliana Bouchardet, Fabiane Ducatti, Luciana Yuri Sato, Vanderlei Stefanuto, Flávia Capaldi, Beatriz de Matteo, Marcelo Cavalcanti, Ivo Rosa.

Aos amigos do LAFISA (Laboratório de Fisiologia das Árvores): Sandra C. Capaldi Arruda, Cantídio Gouvêa, Fernando Grossi, Juliana Fernandes, Edson Namita, Lúcia Basso,, Fábio, João.

Ao José Roberto Romanini, técnico do LAFISA

Ao grande profissional Dr. Gustavo Maia Souza, por sua prontidão.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Importância dos Nutrientes.....	3
2.2 O que é deficiência de nutriente.....	3
2.3 O que é toxidez de nutrientes.....	4
2.4 Nutrientes.....	4
2.4.1 O Cálcio.....	4
2.4.2 Função do Cálcio....	6
2.4.3 Sintomas de deficiência do Cálcio	7
2.4.4 Sintomas de toxidez de Cálcio.....	8
2.5 Temperatura.....	9
2.6 Estresse.....	9
2.7 Estresse e Temperatura.....	10
2.7.1 Relações entre Estresse e Temperatura.....	10
2.7.2 Temperaturas Altas.....	12
2.7.3 Temperaturas Baixas.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Local.....	18

3.2. Quantificação de Açúcares Solúveis Totais – Método da Antrona (Yemm & Willis,1954).....	20
3.3. Quantificação Prolina (Bates 1973).....	21
3.4 Obtenção das Taxas de Crescimento Relativo (TCR).....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Forma de interpretação.....	22
4.2 Açúcares e Temperatura.....	23
4.2.1 Choque térmico a 5°C.....	23
4.2.2 Choque térmico a 15°C.....	28
4.2.3 Choque térmico a 35°C.....	31
4.2.4 Choque térmico a 45°C.....	35
4.3 Prolina.e Temperatura.....	40
4.3.1 Choque térmico a 5°C.....	40
4.3.2 Choque térmico de 15°C.....	44
4.3.3 Choque térmico a 35°C.....	48
4.3.4 Choque térmico a 45°C.....	52
4.4 Taxa de Crescimento Relativo (TCR).....	57
4.3.1 Temperatura a 5°C.....	57
4.4.2 Temperatura 15°C.....	58
4.4.3 Temperatura a 25°C.....	59
4.4.4 Temperatura a 35°C.....	61
4.4.5 Temperatura a 45°C.....	62
5 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 5°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura.....	24
2 Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 5°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura.....	25
3 Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 5°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	26
4 Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 5°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	27
5 Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 15°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura.....	28
6 Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 15°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura.....	29
7 Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 15°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	30

8	Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 15°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	31
9	Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 35°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura.....	32
10	Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 35°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura.....	33
11	Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 35°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	34
12	Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 35°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	35
13	Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 45°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura.....	36
14	Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 45°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura.....	37
15	Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 45°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	38
16	Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 45°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	39
17	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 5°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura.....	41

18	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 5°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura.....	42
19	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 5°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	43
20	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 5°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	44
21	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 15°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura.....	45
22	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 15°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura.....	46
23	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 5°C com adição de 15,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	47
24	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 15°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	48
25	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 35°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura.....	49
26	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 35°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura.....	50
27	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 35°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	51

28	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 35°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	52
29	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 45°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura.....	53
30	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 45°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura.....	54
31	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 45°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	55
32	Quantificação de prolina em plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas à 45°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.....	56
33	Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de todos tratamentos com variação nas concentrações de adição de Ca ao meio de cultura, submetidos à temperatura de 5°C.....	58
34	Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de todos tratamentos com variação nas concentrações de adição de Ca ao meio de cultura, submetidos à temperatura de 15°C.....	59
35	Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de todos tratamentos com variação nas concentrações de adição de Ca ao meio de cultura, submetidos à temperatura de 25°C.....	60
36	Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de todos tratamentos com variação nas concentrações de adição de Ca ao meio de cultura, submetidos à temperatura de 35°C.....	61

37 Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de todos tratamentos com variação nas concentrações de adição de Ca ao meio de cultura, submetidos à temperatura de 45°C.....	62
---	----

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Meio de cultura JADS modificado testado no experimento, quantidades de Ca em mmol.....	19
2. Taxa de crescimento relativo de cada tratamento após o choque térmico até aos 35 dias de cultivo, com variação de temperatura de 5°C.....	58
3. Taxa de crescimento relativo de cada tratamento após o choque térmico até aos 35 dias de cultivo, com variação de temperatura de 15°C.....	59
4. Taxa de crescimento relativo de cada tratamento após o choque térmico até aos 35 dias de cultivo, com variação de temperatura de 25°C.....	60
5. Taxa de crescimento relativo de cada tratamento após o choque térmico até aos 35 dias de cultivo, com variação de temperatura de 35°C.....	61
6. Taxa de crescimento relativo de cada tratamento após o choque térmico até aos 35 dias de cultivo, com variação de temperatura de 45°C.....	62

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
CÁLCIO NA HOMEOSTASE DE BROTAÇÕES DE
Eucalyptus grandis Hill (ex Maiden) SUBMETIDAS A
DIFERENTES TEMPERATURAS *in vitro***

Autora: MARÍLIA MACHADO CRESTANA CANTARELLI

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

RESUMO

Este trabalho foi realizado para avaliar a influência de diferentes concentrações de cálcio na homeostase de brotações de *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) submetidas a diferentes temperaturas *in vitro*. As concentrações de cálcio adicionadas ao meio JADS foram: 0,0; 2,5; 5,0 e 10,0 mmol. As temperaturas foram 5°C; 15°C; 25°C; 35°C e 45°C. A temperatura controle foi estabelecida com sendo 25°C. Parâmetros fisiológicos tais como: Açúcares Solúveis Totais; Concentração de Prolina e Taxa de Crescimento Relativo foram avaliados para verificar o efeito do estresse térmico sobre a capacidade de homeostase do material. Os resultados indicaram que as concentrações de cálcio afetaram as respostas das plantas submetidas a altas e baixas temperaturas. Em geral, as plantas submetidas a baixas temperaturas requereram mais cálcio do que aquelas submetidas às altas temperaturas para manutenção das suas homeostases.

**INFLUENCE OF DIFFERENT CONCENTRATION OF
CALCIUM ON THE HOMEOSTASIS OF SHOOTS OF
Eucalyptus grandis Hill (ex Maiden) SUBMITTED TO
DIFFERENT TEMPERATURES *in vitro*.**

Author: MARÍLIA MACHADO CRESTANA CANTARELLI

Adviser: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

SUMMARY

This work was carried out to evaluate the influence of different Calcium concentrations on the homeostasis of shoots of *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) submitted to different temperatures *in vitro*. The Calcium concentrations, added to the JADS medium, were: 0,0; 2,5; 5,0 and 10,0 mmol. The temperatures were: 5°C; 15°C; 25°C; 35°C and 45°C. The control temperature was established as being 25°C. Physiological parameters such as: Total Soluble Sugars; Proline Concentration and Relative Rate Growth were evaluated to verify the effects of the thermal stress on the material homeostasis capacity. The results indicated that Calcium concentrations affected the responses of shoots submitted to high and low temperatures. In general, the shoots submitted to the lower temperatures required more Calcium than those submitted to the higher ones for the maintenance of their homeostasis.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa lugar de destaque no que diz respeito à tecnologia em termos de silvicultura clonal na produção de eucalipto especialmente de interesse comercial. Destacando-se as facilidades e segurança de produção possível através da propagação *in vitro*, sendo possível através desta técnica conseguir materiais genéticos superiores, livres de patógenos, resistentes a pragas e doenças, geneticamente idênticos, tolerantes a estresses ambientais e que apresentam altas taxas de crescimento.

Uma das maneiras de alcançar tais características desejáveis que levam a produtividade superior é o estudo da nutrição *in vitro* relacionada com a temperatura, ajustando se adequadamente quantidades de Ca para uma melhor resposta perante os estresses térmicos.

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 à importância da análise qualitativa e quantitativa da concentração de cada elemento exigido pela cultura.

O efeito da temperatura influi no desenvolvimento das plantas, na absorção dos nutrientes além da interação dos nutrientes, o estudo da variação da temperatura é de real importância, no que diz respeito à cultura de *Eucalyptus* que podem através dele solucionar diversos problemas gerados pela má ou indevida absorção de nutrientes que gera diretamente indivíduos deficientes ou que não desenvolvam seu potencial real (Malavolta, et al. 1974). Tendo em vista que trabalhos relacionados com absorção de nutrientes e temperatura *in vitro* são escassos no que diz respeito à cultura de *Eucalyptus*.

Os clones de *Eucalyptus grandis* e seus híbridos são os mais utilizados na

silvicultura clonal nas regiões tropicas e subtropicais do Brasil.

A compreensão dos efeitos das temperaturas alta e baixa na nutrição mineral de eucalipto contribuirá de forma substancial para a cultura desta essência florestal tanto *in vitro*, como em casa de vegetação e nas regiões de maior plantio comercial.

Este trabalho teve como objetivo verificar a influência de diferentes concentrações de cálcio na homeostase de alguns parâmetros fisiológicos (teor de açúcares solúveis totais e prolina além da taxa de crescimento relativo) de brotações de *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) submetidas a diferentes temperaturas *in vitro*.

Entende-se por homeostase a capacidade de um sistema retornar a sua condição normal após ter sofrido uma perturbação (Kauffman, 1993).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância dos Nutrientes

De acordo com Malavolta (1997), os elementos, macro e micro, exercem funções específicas na vida da planta, podendo haver, dependendo do elemento, um certo grau de substituição.

Na formulação dos meios de cultura, a concentração de um elemento deve ficar entre os limites da deficiência e da toxicidade. Estes limites podem variar significativamente em relação a outras mudanças na composição do meio de cultura, como resultado da interação entre seus componentes. Portanto, os valores limites estabelecidos para um determinado meio de cultura são válidos apenas para aquela situação. Nestas circunstâncias, a seleção do meio de cultura deve ser cuidadosa, sendo que a análise dos tecidos pode ser utilizada satisfatoriamente para orientar nesta seleção (Teasdale, 1987).

2.2 O que é deficiência de nutriente

Segundo Epstein (1975), deficiência de elementos essenciais levam a desarranjos metabólicos que eventualmente se manifestam em anormalidade visíveis. O crescimento global e o desenvolvimento da planta podem ser afetados, pode haver sintomas macroscópicos característicos e podem ocorrer mudanças na aparência de estruturas celulares.

2.3 O que é toxidez de nutrientes

A toxidez, tanto quanto a deficiência, causa alterações no metabolismo da planta, modificando os aspectos bioquímicos, morfológicos e anatômicos, os quais se manifestam de forma visível, sendo característico para cada toxidez ou deficiência (Silveira et al. 1999).

2.4 Nutrientes

2.4.1 O Cálcio

O cálcio apresenta papel importante na morfogênese, devido à interação com substâncias reguladoras do crescimento. Parece haver uma associação entre o cálcio e as citocininas, principalmente nas áreas onde está ocorrendo a diferenciação em gemas. A formação de protocomos, a partir do calo de *Dendrobium fibriatum*, foi pobre na ausência de cálcio (George et al., 1988). Mengel & Kirkby (1987) comentam que altas doses de cálcio no meio de cultura, retardaram a abscisão de folhas de trigo e a senescência em folhas de milho, sendo também requerido para divisão e alongamento celular.

Conforme Epstein (1975), o cálcio é o catiônio principal da lamela média da parede celular na forma de pectato. O elemento tem por isso importante relação com a resistência mecânica dos tecidos.

Pelo fato do cálcio ser um elemento pouco móvel dentro da planta e devido à maior exigência dos tecidos mais jovens por este elemento, sua importância na cultura *in vitro* assume um caráter particular. É um elemento transportado basicamente por processos passivos, os quais são extremamente influenciados pela taxa transpiratória. Desta forma, muitas vezes ocorrem sintomas de necrose nas gemas terminais devido à baixa atividade transpiratória dos explantes cultivados *in vitro*. Estes sintomas podem ser prevenidos pela diminuição das taxas de crescimento, pela modificação do ambiente de

cultura ou pelo aumento dos níveis de cálcio no meio de cultura (McCown & Sellmer, 1987).

O cálcio tem papel extremamente importante no metabolismo da planta (Ting, 1982), É um nutriente mineral não tóxico, mesmo presente em altas concentrações, auxilia na desintoxicação de altas concentrações de outros elementos minerais na planta (Marschner, 1986). Nas plantas, o cálcio é um dos principais mensageiros dentro do sistema de transmissão de estímulos externos (Penel & Greppin, 1979).

Segundo Malavolta (1997), possui função estrutural, onde o elemento faz parte da molécula de um ou mais compostos orgânicos, o Ca: pectato (=sal de ácido poligalacturônico da lamela média da parede celular). Tem, também, muitos efeitos no crescimento e desenvolvimento da planta.

De acordo com Malavolta (1980), o pectato de cálcio aumenta a rigidez da parede e dificulta o aumento no tamanho da célula. Em células mais maduras o Ca pode estar na parede na forma de carbonato, oxalato, sulfato, fosfato, tartarato ou citrato. Sais calcínicos cristalinos ocorrem mais freqüentemente nos vacúolos de células especializadas chamadas idioblastos. Entre esses sais predomina o oxalato que se encontra em qualquer parte da planta, havendo algumas provas de que pode sofrer dissolução e ser reciclado. Outros sais de Ca encontrados (fora das paredes) são: carbonato, sulfato, fosfato, silicato, citrato, tartarato, malato e, possivelmente, complexos insolúveis com ácidos graxos. A insolubilidade dos compostos de Ca da planta e sua localização na célula explicam em parte a falta de redistribuição em condições de deficiência o que provoca aparecimento de sintomas de “fome” em órgãos ou partes mais novas: gemas, pontas de raiz.

Os níveis de cálcio não devem ultrapassar 30 mmol, pois metade desta concentração é adequada para o crescimento e muitas plantas. Os níveis nos tecidos, considerados adequados, estão por volta de 125 $\mu\text{moles.g}^{-1}$ de matéria seca (Epstein, 1975; McCown & Sellmer, 1987). Segundo George et al. (1988), os níveis de cálcio nos meios de cultura são classificados como baixo (1,1 mmol); médio (2,57 mmol) e alto (4,04 mmol).

De acordo com Arruda (2000), uma das principais funções do Ca é atuar na formação da parede celular e nos processos de divisão celular.

Fosket (1994), afirma que o Ca, através da formação de um gradiente de concentração, aparece como um dos principais responsáveis tanto no estabelecimento da polaridade celular como na organização do citoesqueleto.

Conforme trabalhos desenvolvidos por Feijo et al. (1995) e Malho & Trewavas (1996), o Ca está diretamente envolvido nas funções do citoesqueleto nos seguintes processos: movimentos flagelados, divisão celular, ciclos e crescimento polarizado (abrangendo crescimento apical e extensões celulares). Segundo Marmé (1998), outra função atribuída ao Ca é a fosforilação de proteínas em plantas, a qual, deve ser regulada por concentrações fisiológicas de cálcio, sendo que parte desta regulação, estaria mediada pela camoldulina.

2.4.2 Função do Cálcio

A função mais importante do cálcio na planta é exercida através da camoldulina que é um polipeptídeo consistido de 148 aminoácidos, ligado com até quatro Ca^{2+} formando uma estrutura compacta pela mudança na configuração e deslocando a secção hidrofóbica da cadeia polipeptídica; ativa inúmeras enzimas, incluindo fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos, ciclase de adenilado, ATPase está envolvido também na síntese de α -amilase (Silveira et al. 2000).

O cálcio é essencial também no desenvolvimento radicular. A secreção de H^+ induzida pela auxina nas células meristemáticas ocorre pela troca de Ca^{2+} por H^+ . Com isso, há o abaixamento do pH da parede celular, que se torna menos rígida permitindo o aumento do volume celular.

As camoldulinas não têm atividade enzimática, mas modulam, associadas ao Ca, a atividade de enzimas e de proteínas não enzimáticas (Malavolta, 1997),

De acordo com Malavolta (1997), o Ca tem muitos efeitos no crescimento e desenvolvimento da planta: atrasa o amadurecimento, a senescência e a abscisão;

melhora a qualidade dos frutos e hortaliças, altera a resposta geotrópica, a fotossíntese e outros processos como a divisão celular, movimentos citoplasmáticos e o aumento do volume celular. É essencial para manter a integridade estrutural das membranas e das paredes celulares: quando há deficiência as membranas começam a vazar, a compartimentação celular é rompida e a ligação do Ca com a pectina da parede celular é afetada. O pectato de Ca da lamela média atua como cimento entre uma célula e outra, sendo depositado durante a citocinese.

Quando as células crescem aumentam a superfície de contato entre elas, aumentando também a necessidade do suprimento de Ca.

Malavolta (1980), admite-se que o Ca^{2+} é indispensável para manter a estrutura e o funcionamento normal das membranas celulares, particularmente o plasmalema. Esse papel do Ca^{2+} sugere a importância de se manter no solo um nível do elemento para garantir, entre outras coisas, a absorção adequada dos elementos e, através disso, a produção.

A falta ou ausência de cálcio reduz a síntese de parede celular, evidenciando o papel deste cátion na manutenção da estrutura celular (Eklund e Eliasson, 1990).

2.4.3 Sintomas de deficiência do Cálcio

Os sintomas de deficiência de Ca aparecem primeiro e são mais severos nas regiões meristemáticas e folhas novas. A necessidade de Ca nesses tecidos parece ser alta e os elementos contidos nos mais velhos, maduros, tende a ser imobilizado neles não sendo translocado para as regiões novas que crescem ativamente. Os pontos de crescimento são danificados ou morrem. O crescimento das raízes é afetado severamente. Muitos dos solos deficientes em cálcio são ácidos de modo que a deficiência propriamente dita pode ser acompanhada por níveis tóxicos de íônios hidrogênio e de metais pesados como alumínio, manganês e outros que tendem entrar em solução quando, o pH é baixo. As raízes danificadas se tornam susceptíveis à infecção por bactérias e fungos (Epstein, 1975).

Malavolta 1980, nas folhas o denominador comum para a falta de Ca é uma clorose nas mais novas, clorose essa que em geral caminha das margens para o centro. Sintomas que aparecem em frutos (tomateiro e macieira) fazem-no porque as folhas vencem a competição pelo cálcio contido no xilema, já que transpiram mais.

A falta de cálcio afeta particularmente os pontos de crescimento da raiz; aparecem núcleos poliplóides, células binucleadas, núcleos constrictos, divisões aminióticas; cessa o desenvolvimento, há escurecimento e morte.

Cerca de 60% do Ca total das folhas esta presente nos cloroplastos: a acumulação do elemento nessas organelas é dependente do fornecimento de energia, o mesmo acontecendo no caso dos mitocôndrios.

Mengel & Kirkby (1987) descrevem os sintomas de deficiência de cálcio apresentando uma redução no crescimento do tecido meristemático, observada primeiramente na região do crescimento apical e nas folhas mais novas; que tornam-se deformadas e cloróticas e nos estágios mais avançados uma clorose das margens das folhas e os tecidos afetados tornam-se “moles”, devido a dissolução da parede celular.

Como o crescimento vegetativo depende do Ca e os processos de divisão e alongamento celulares são afetados pela concentração do íon, a deficiência de Ca deverá em uma inibição de crescimento e levar ao desenvolvimento de desordens fisiológicas, já que a concentração de cálcio citossólico livre regula diversos eventos intracelulares, como o crescimento, desenvolvimento, metabolismo e outras funções medianas por fitorreguladores (Hepler & Wayne, 1985).

2.4.4 Sintomas de toxidez de Ca

De acordo com Borle (1981), qualquer tipo de injúria à membrana plasmática pode conduzir a um aumento significativo da entrada de cálcio no citoplasma e, neste caso, a mitocôndria serviria como um reservatório intracelular que seqüestraria temporariamente o cálcio em excesso (Akerman & Nicholls, 1983), quando a capacidade

mitocondrial é excedida, as concentrações excessivas de cálcio podem exercer efeitos tóxicos.

2.5 Temperatura

A temperatura atua em todo o processo fisiológico e é uma variável importante que influencia o desenvolvimento dos explantes. O efeito da temperatura na planta é em grande parte pelos efeitos reações químicas (Larcher, 2000).

Embora cada espécie florestais tolerarem temperaturas consideravelmente diferentes, para cada espécie existe uma temperatura ótima no qual se atinge o crescimento ótimo. A determinação do ótimo de temperatura é freqüentemente difícil (Malavolta, 1974).

2.6 Estresse

Há dois tipos básicos de resistência ao estresse: resistência elástica, que é a capacidade do organismo de prevenir injúrias reversíveis quando exposto a um específico estresse ambiental; e resistência plástica, que é a capacidade de prevenir injúrias irreversíveis (tensão plástica). A resistência ao estresse possui dois componentes: a) propriedades inatas da planta em se opor à produção de tensões por um determinado estresse, e b) um sistema reparador de tensões reversíveis. A ação destes dois componentes confere a planta sua capacidade de adaptação às condições de estresse ambiental (Levitt, 1972).

De acordo com Larcher (2000), o estresse é, na maioria das definições, considerado como um desvio significativo das condições ótimas para a vida, e induz a mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes. Mesmo se uma condição de estresse é somente temporária, a vitalidade da planta torna-se cada vez menor conforme a duração do estresse. O estresse é considerado como um evento direcional, causado por

fatores altamente específicos, são realizados estudos no sentido de compreender a maneira pela qual os fatores de estresse produzem seus efeitos.

Não necessariamente todas as mudanças ocasionadas pelo estresse devam ser classificadas como protetoras ou deletérias. Se a planta está ou não sofrendo estresse em uma determinada situação, é uma questão que somente pode ser respondida tendo por referência o comportamento normal (Larcher, 2000).

Todo órgão da planta é afetado pelo estresse, mesmo se apenas uma parte limitada da planta foi inicialmente envolvida. A coordenação da resposta de estresse no corpo da planta é realizada pelos hormônios vegetais. Logo que uma parte da planta sofre um distúrbio, ocorrem, como uma resposta não-específica, mudanças no sistema de hormônios. Essas mudanças condicionam o metabolismo que tem por efeito em curto prazo, bem como os processos morfogênicos de longo prazo, no sentido de minimizar o estresse e preservar a vida da planta (Larcher, 2000).

2.7 Estresse e Temperatura

2.7.1 Relações entre Estresse e Temperatura

Calor e frio são estados termodinâmicos caracterizados, respectivamente, pela alta e baixa energia cinética das moléculas. O calor acelera os movimentos das moléculas; as ligações químicas que associam os átomos, formando as moléculas, tornam-se mais fracas e as camadas de lipídios das biomembranas tornam-se mais fluidas. Na situação térmica oposta, em baixas temperaturas, as biomembranas ficam mais rígidas e aumentam a energia de ativação necessária para realizar os processos bioquímicos (Larcher, 2000).

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 poliaminas (Guy, 1990). Koster & Lynch (1992) consideram o açúcar, como sendo crioprotetor, quando ele se encontra acumulado em compartimentos extravacuolares.

A exposição das plantas à baixa temperatura causa também alterações ao nível de membrana mitocondrial, fazendo com que os produtos intermediários da glicólise, e as trioses acumulem-se no citossol (Salisbury & Ross, 1991). Algumas enzimas da glicólise, como o piruvato cinase, a fosfofrutocinase e a fosfotransferase dependente de pirofosfato, são termossensíveis. Como a glicólise e a glicogênese são processos essenciais para o metabolismo da planta, estes devem continuar, quando a planta é exposta a uma condição de estresse por baixa temperatura. Desta forma, estas enzimas respiratórias podem ser desreguladas, durante o processo de aclimação, para um posterior ajuste do metabolismo. Este ajuste pode levar a um aumento no teor de açúcares crioprotetores nos tecidos fotossintéticos, participando de um mecanismo de tolerância desencadeada pela planta (Guy, 1990).

A prolina, um dos crioprotetores, é um aminoácido que pode ser acumulado nas plantas sob condições de estresse, como salino, hídrico e de temperatura. A prolina é um soluto intracelular não-tóxico, que protege a célula contra os efeitos da hiperosmolaridade, induzida pela desidratação da célula, durante o processo de congelamento lento (Withers & King, 1979). Aplicando-se prolina exogenamente a um tecido, este confere maior estabilidade à membrana celular, tornando a célula mais tolerante à desidratação, à deformação e à compressão, ao ser submetida a algum tipo de estresse. A prolina, acumulada em plantas submetidas a vários tipos de estresse, pode circular livremente pela planta e tende a acumular-se, em altas concentrações, nas folhas mais jovens e nos brotos. Após o término do período de estresse, observou-se uma queda na sua concentração, sugerindo que a prolina poderia ser utilizada, como fonte de energia e de esqueleto de carbono e nitrogênio, para uma recuperação mais rápida do tecido vegetal (Aspinall & Paleg, 1981).

2.7.2 Temperaturas Altas

Conforme Larcher (2000), altas temperaturas causam alterações reversíveis no estado físico-químico das biomembranas e na conformação das moléculas de proteína. As plantas podem sobreviver sob altas temperaturas por meio de proteção (prevenção) e da dissipação em relação ao calor, bem como em função da capacidade do protoplasma de tolerar o calor, tendo o protoplasma a tolerância ao calor uma propriedade altamente específica.

O efeito do calor depende de sua duração, ou seja, ele segue a regra da dose (Belehradék¹, citado por Larcher, 2000), a qual denota que pouco calor por um longo período causa tanta injúria quanto um intenso calor por um curto período.

A aclimação ao calor ocorre rapidamente em resposta ao estresse provocado por altas temperaturas; as mudanças para limites de temperatura mais elevados podem se consumir dentro de horas. A forma mais efetiva de proteção ao calor; e proporcionada por proteínas específicas, proteínas de choque de calor (“Heat Shock Proteins” – HSP), as quais são rapidamente transcritas pelo núcleo celular, sintetizadas no citoplasma e transferidas para os cloroplastos e para as mitocôndrias (Morimoto², citado por Larcher, 2000). Essas proteínas desaparecem em poucas horas após a retirada do fator de estresse.

As altas temperaturas podem ter efeitos prejudiciais em vários organismos devido à alteração na permeabilidade das membranas, desnaturação de proteínas ou mudanças na viscosidade dos lipídios das membranas(Perez e Moraes, 1990).

O estresse por altas temperatura causa a diminuição do acúmulo de amido, dispersão de eletrólitos e impede a síntese de proteínas, mas produz a síntese de um particular tipo de proteína: a proteína do corpo de calor a “heat shock proteins”.

Temperaturas elevadas produz um efeito geral sobre o metabolismo: as reações químicas do metabolismo se realizam mais velozmente com o aumento da temperatura e a diferente dependência da temperatura de várias reações metabólicas provocam

¹ BELEHRADÉK, J. Physiological aspects of heat and cold. **Annual Review. Physiology.**, v. 19, p. 59-82, 1957.

² MORIMOTO, R. I. Cell in stress: transcriptional activation of heat shock genes. **Science.**, v.259, p.1409-1410, 1993.

readaptamento do metabolismo celular. Se a temperatura se eleva além do valor limite a estrutura biológica e principalmente toda a estrutura lipoproteica e então as proteínas solúveis se desnaturam e perdem sua atividade. Quando o dado é limitado pode ocorrer uma rápida mudança da mesma estrutura com conseqüente maior consumo de energia e por isso a respiração e consumo das reservas. No caso contrário ocorre a morte do tecido.

O trabalho realizado por Tawfik et al. (1996), foi desenvolvido para investigar o aspecto da aplicação de cálcio e nitrogênio na concentração de cálcio nas folhas, taxa de transpiração, termo-estabilidade das membranas, e acumulação e distribuição de biomassa durante estresse produzido por altas temperaturas. Plantas de batatas da variedade Russet Burbank (*Solanum tuberosum* L.) foram micropropagadas e logo transplantadas em vasos e 1 litro de capacidade contendo solo e perlita (1:1 volume). As plantas foram expostas a temperaturas de 30-20° C(D/N) durante 4 semanas (9-12 semanas depois de serem transplantadas) em uma câmara de crescimento com todos os fatores de meio ambiente controlados. A temperatura máxima foi mantida por 6 horas metade do fotoperíodo de 14 horas. Os tratamentos foram de nitrogênio antes do estresse (NBS), durante o estresse (NDS) e cálcio e nitrogênio durante o estresse (Ca + NDS). Todos os tratamentos tiveram a mesma quantidade total de nitrogênio. Os níveis de cálcio do solo sem alteração (550 mg/Kg solo) foram suficientes para o crescimento das plantas de batata abaixo da temperatura normal.

As plantas tratadas com cálcio e nitrogênio tiveram as concentrações mais altas de cálcio nas folhas assim como também a taxa de transpiração até durante duas semanas após o período de estresse causado por altas temperaturas. Após 4 semanas do período de estresse, a área total assim como o peso seco foram medidos nas folhas de recente maturação. Os resultados mostraram que estes foram significativamente maiores em plantas NDS e Ca + NDS do que em plantas NBS. A termo-estabilidade da membrana celular (cuja medida é baseada na perda de íons de discos de folhas submetidos a altas temperaturas) não foi afetada por nenhum tratamento antes do estresse. No entanto, o tecido foliar das plantas Ca + NDS exibiam uma maior termo-estabilidade da membrana comparada com a das plantas NBS após 2 a 4 semanas de estresse causado por altas

temperaturas. Na colheita, as plantas NDS e CA + NDS tiveram valores de folha/talo (taxa de peso fresco) significativamente maiores comparadas com os das plantas NBS. Assim mesmo, as plantas Ca + NDS tiveram valores de biomassa e número de tubérculos significativamente maiores do que as plantas NBS e NDS. Os resultados de presente trabalhos sugerem que alguns efeitos negativos do estresse causado por altas temperaturas no crescimento da planta. Os dados também sugerem que após a melhora pode-se manter a produção da planta quando as temperaturas ótimas para o crescimento são restauradas (Tawfik et al. 1996).

2.7.3 Temperaturas Baixas

Conforme a temperatura diminui e, paralelamente, a velocidade das reações químicas também, como consequência o equilíbrio das reações químicas se altera em direção à liberação de energia (princípio de Le Chatelier – Princípio enunciado em 1888 por Henri Chatelier: “Quando um fator externo, como por exemplo, uma variação de temperatura, pressão ou concentração, atua sobre um sistema em equilíbrio, o equilíbrio se desloca no sentido de anular este fator”). Dessa forma, sob o frio, menos energia metabólica está disponível, a absorção de água e de nutrientes é restringida, os processos de biossíntese ocorrem em menor intensidade, a assimilação é reduzida e o crescimento é interrompido. Quanto mais freqüente, mais longo e mais frio forem os períodos de baixa temperatura, mais sérias serão as consequências para a planta (Larcher, 2000).

O primeiro efeito do estresse por baixa temperatura, observado em plantas, ocorre em nível de membranas. Por estas apresentarem uma composição basicamente lipídica, o seu estado físico é alterado, pela mudança da temperatura, passando de um estado cristal líquido para um gel sólido, reduzindo sua fluidez. Algumas plantas apresentam a capacidade de se aclimatarem à na condição, em que a composição das suas membranas apresentam um teor de ácidos graxos insaturados maior do que em condições normais, resistindo à baixa temperatura (Lyons, 1973). Atualmente, a alteração na

composição lipídica da membrana é aceita, como uma forma preventiva da planta para resistir à exposição a temperaturas ainda mais baixas (Yordanov, 1992).

Além disso, não está bem claro qual seria o primeiro sítio de dano da baixa temperatura na plasmalema. De acordo com Palta (1990), antecedendo as alterações na camada lipídica, ocorreriam mudanças funcionais e conformacionais na H⁺-ATPase, que apresentaria redução na sua atividade, ao ser submetida à temperatura de -5 a 0°C. Já sob temperaturas não letais (acima do ponto de congelamento), esta aumentaria sua atividade, na qual a alteração da composição da camada bilipídica teria uma função muito importante.

Mudas de tomate, com sistema radicular em solução nutritiva a 10°C, por duas semanas, seguida por restabelecimento da temperatura de 18°C, apresentaram diminuição na área foliar e no peso de matéria seca (Fayad, 1998).

Trabalhando com tomate cv. *Criterion*, encontrou alteração no crescimento e no desenvolvimento da planta quando a temperatura média de 21°C foi mudada para 12°C por período de 2 horas, em período diurno e noturno; encontrou redução de 28% na altura da planta, 21% no comprimento dos internos, decréscimo na produção de matéria seca e no campo. No campo, a temperatura do solo variou de 35 a 38°C, sendo que na estufa permaneceu próxima a 30°C.

A sensibilidade ao frio, é uma característica de muitas plantas de origens tropicais e subtropicais, envolvem a sensibilidade a baixas temperaturas, mas não congelantes. Tais plantas sofrem estresse em respostas a baixas temperaturas, tipicamente numa variação de 10-12°C. Se expostas a temperaturas abaixo do resfriamento por pouco tempo este não é suficiente para causar injúrias e o efeito é reversível, e a ciclose é conseguida através do reaquecimento. Exposições prolongadas, entretanto, levam a uma injúria permanente em uma dose-depende de maneira tal que quanto mais longa a exposição e mais baixa a temperatura, maior é a injúria (Lyons, 1973). A sensibilidade ao resfriamento produz espécies que crescem fora da sua gama adaptativa, e nestes casos, perdas econômicas podem ser devido ao estresse e a injúrias do resfriamento. Além disso, a sensibilidade à temperatura de resfriamento podem afetar a vida de estocagem

após colheita de certas mercadorias agrícolas por causa de métodos de estocagem em baixas temperaturas apropriados para espécies resistentes ao resfriamento que são frequentemente inadequados para espécies sensíveis ao resfriamento.

Williamson & Ashley (1982), mediram a concentração de Ca^{2+} e demonstraram o papel importante do Ca^{2+} citoplasmático na regulação da corrente citoplasmática em células internodais gigantes de algas da espécie *Chara cotallina* e *Nitela* sp. Examinando células microinjetadas com Ca^{2+} com as proteínas específicas foi possível demonstrar que existiam nestas células compartimentos citoplasmático e vacuolar de Ca^{2+} livre. Seus resultados demonstravam que a concentração de cálcio citoplasmático estava em uma variação submicromolar, tanto quanto em células animais, e a concentração de cálcio vacuolar foi maior que 0,1 mmol (o limite efetivo superior do estudo). Além disso, a ciclose dependente ATP dessas células foi inibida pelo elevamento citoplasmático de Ca^{2+} . Os autores sugerem que seus resultados a respeito de ambas as concentrações e regulação da corrente cálcio citoplasmático podem ser continuamente extrapolada por plantas mais altas. O trabalho de Woods *et al.* (1984) comparando células sensíveis ao resfriamento e plantas resistentes ao congelamento é consistente com a hipótese que indicada pelos resultados de que a dinâmica da flutuação de cálcio intracelular está envolvida na regulação da corrente citoplasmática nesta células de plantas mais altas. Além disso, tais resultados sugerem que o evento chave na sensibilidade ao resfriamento é marcada por um rápido aumento na concentração de cálcio citoplasmático em plantas sensíveis ao resfriamento sob condições de temperaturas abaixo do patamar ótimo. Recentemente, também reconheceu-se que o fluxo intracelular de Ca^{2+} pode providenciar má explanação para as mudanças citológicas observadas em células estressadas pelo resfriamento e apresentaram uma opinião na qual ele argumenta que o cálcio pode ter um papel como transdutor fisiológico primário de injúria ao resfriamento.

Os resultados de Woods *et al.* (1984) indicaram que o estresse de resfriamento levou a uma quebra no compartimento subcelular de Ca^{2+} , possivelmente devido à perda da fluidez da membrana, resultando numa elevação na concentração de Ca^{2+} citoplasmático livre suficiente para inibir a ciclose.

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 potencial hídrico entre o espaço intracelular e a atmosfera ambiente. Isto pode ocasionar redução da absorção de água, pelo sistema radicular, e conseqüente fechamento dos estômatos, redução da transpiração, redução da taxa fotossintética e redução de crescimento (Nobel, 1991 e Salisbury & Ross, 1991).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia das Árvores do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, em Piracicaba, São Paulo.

Foi testado o material genético de clone de *Eucalyptus grandis* mantido sob cultura *in vitro* no laboratório.

O meio de cultura utilizado foi o JADS (Correia, 1993) modificado por Higashi (1996). O pH do meio de cultura ajustado para 5,8 utilizando-se NaOH a 1M, antes da autoclavagem.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e PAR (radiância fotossinteticamente ativa) de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ fornecida por luz branca fria localizada 30 cm acima do nível de cada prateleira. A temperatura foi mantida a 25°C, até a obtenção de quantidade suficiente de material vegetal para os experimentos.

As condições de temperatura testadas foram de 5°C, 15°C, 35°C e 45°C, em câmara de germinação tipo BOD, modelo MA 403. Marconi, pelo período de 8 horas para as temperaturas baixas e de 2 horas para as altas, utilizando-se como temperatura controle 25°C. As doses de cálcio testadas no experimento estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Meio de cultura JADS modificado testado no experimento, quantidades de Ca em mmol.

Nutrientes	0 mmol Ca	2,5 mmol Ca	5,0 mmol Ca	10,0 mmol Ca
NH ₄ NO ₃	11	8,5	6	6
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0	2,5	5	5
Ca Cl ₂ 2H ₂ O	0	0	0	5
KH ₂ PO ₄	3	3	3	3
KNO ₃	8	8	8	8
Mg SO ₄ · 7H ₂ O	3	3	3	3
Fe SO ₄ · 7H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2
H ₃ BO ₃	0,05	0,05	0,05	0,05
Cu SO ₄ · 5H ₂ O	0,005	0,005	0,005	0,005
Mn SO ₄ · H ₂ O	0,1	0,1	0,1	0,1
Zn SO ₄ · 7H ₂ O	0,015	0,015	0,015	0,015
Na ₂ Mo O ₄ · 2H ₂ O	0,001	0,001	0,001	0,001
Co Cl ₂ · 6H ₂ O	0,001	0,001	0,001	0,001
Ácido Nicotínico	0,004	0,004	0,004	0,004
Piridoxina	0,002	0,002	0,002	0,002
Tiamina	0,014	0,014	0,014	0,014
Meso-Inositol	0,5	0,5	0,5	0,5
Arginina	0,04	0,04	0,04	0,04
Glutamina	0,99	0,99	0,99	0,99
Cisteína	0,02	0,02	0,02	0,02
Pantotenato de Ca	0,005	0,005	0,005	0,005
Sacarose	0,011	0,011	0,011	0,011

Após o choque térmico, parte do material foi analisado para avaliar os efeitos destes tratamentos e parte do material retornou às condições normais de cultura. Após 24h os materiais foram reavaliados para verificar um provável efeito homeostático. O restante do material submetida às variações de temperatura permaneceu por mais 21 dias em cultivo para avaliação de possíveis efeitos sobre o crescimento.

Os parâmetros avaliados após as variações de temperatura e recuperação

imediatamente após o choque, 24 horas e aos 21 dias foram:

- a) determinação dos teores de prolina (Bates et al., 1973);
- b) quantificação de açúcares solúveis totais (Yemm e Willis, 1954) e,
- c) determinação das taxas de crescimento relativo, TCR. (Hunt, 1982).

As comparações foram realizadas através de gráficos contendo barras de erro, o que facilita muito a visualização das diferenças, no caso das quantificações dos teores de açúcares solúveis totais e prolina, já quanto à avaliação da taxa de crescimento relativo foram utilizados gráficos de linha, além das médias de TCR de cada tratamento e desvio padrão das médias.

Os tratamentos que apresentam 0 mmol de fonte externa de Ca foi denominado T1 e comparado durante os experimentos com o tratamento denominado TC1 que também é isento de fonte externa de Ca mas, mantido durante todo o período à temperatura controle de 25°C. Os demais tratamentos denominados T2, T3 e T4, contendo 2,5 mmol de adição de Ca; 5,0 mmol de adição de Ca e 10 mmol de adição de Ca ao meio de cultura, respectivamente, foram comparados com TC2, TC3, TC4, que também possuíam as mesmas quantidades de nutrientes cada qual, e mantidos à 25°C.

3.2 Quantificação de Açúcares Solúveis Totais – Método da Antrona (Yemm & Willis, 1954)

Utilizando-se amostras de aproximadamente 500 mg (peso de matéria fresca) maceradas com 10 mL de etanol 80% (V/V), filtradas e após evaporação em estufa a vácuo a 45°C, o material foi ressuscitado em 30 mL de água destilada deionizada mantidos em agitação.

Para a determinação dos teores de açúcares solúveis totais, utilizou-se 1 mL de cada material ressuscitado adicionando-se 5 mL de reagente de Antrona, a mistura foi aquecida durante 10 minutos a 100°C e resfriadas em banho de gelo para posterior leitura em espectrofotômetro com absorvância de 625nm.

3.3 Quantificação de Prolina (Bates 1973)

Para a extração de prolina, foram utilizados 1000 mg de material vegetal fresco de cada amostra, macerados em 10 mL de solução 3% de ácido sulfossalicílico e, posteriormente filtrados.

Utilizou-se 2 mL de material extraído juntamente com 2 mL de ácido acético glacial e 2 mL de ninidrina ácida, mantidos a 100°C durante 1 hora e resfriados em banho de gelo.

3.4 Obtenção da Taxas de Crescimento Relativo (TCR)

Para a determinação das taxas de crescimento relativo (TCR), foi utilizada a equação apresentada por Hunt (1982), que segue abaixo, modificada para este trabalho para a obtenção dos dados.

$$TCR = \left| \frac{\ln PMS(X_n) - \ln PMS(X_0)}{T(X_n) - T(X_0)} \right| \quad \text{onde,}$$

$PMS(X_n)$ = Peso de matéria vegetal seca média tomada ao final de cada período de amostra;

$PMS(X_0)$ = Peso de matéria vegetal seca média tomada ao início de cada período de amostra;

$T(X_n)$ = Tempo final do período e,

$T(X_0)$ = Tempo inicial do período.

Os valores de peso fresco e peso seco dos materiais, que foram obtidos semanalmente até 21 dias de cultivo após o choque térmico.

A secagem do material foi realizada em estufa de circulação fechada a 60°C até obtenção de peso constante (aproximadamente 48 horas).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Forma de interpretação

Neste trabalho, utilizou-se o conceito de Levitt (1972), no qual existem dois tipos básicos de resistência ao estresse: resistência elástica, que é a capacidade do organismo de prevenir injúrias reversíveis quando exposto a um específico estresse ambiental; e resistência plástica, que é a capacidade de prevenir injúrias irreversíveis (tensão plástica). A resistência ao estresse possui dois componentes: a) propriedades inatas da planta em se opor à produção de tensões por um determinado estresse, e b) um sistema reparador de tensões reversíveis. A ação destes dois componentes confere a planta sua capacidade de adaptação às condições de estresse ambiental (Levitt, 1972).

Destaca-se novamente a colocação de Kauffman (1993) onde, homeostase é a capacidade de um sistema retornar a sua condição normal após ter sofrido uma perturbação.

De acordo com Souza (2001), a capacidade homeostática do *E. grandis*, foi severamente afetada a baixas temperaturas quando comparadas aos efeitos das temperaturas elevadas. Isto não é totalmente surpreendente, uma vez que a espécie estudada é de origem tropical e subtropical, provavelmente mais adaptada a temperaturas altas.

Os períodos que foram considerados para análise foram imediatamente após o choque térmico, 24 horas e 21 dias após os tratamentos térmicos.

Para verificação do nível de estresse que afetou as brotações, a comparação foi realizada entre tratamentos com as mesmas quantidades de nutrientes sendo àqueles

submetidos ao choque térmico comparados com àqueles mantidos em temperatura ideal de crescimento.

A verificação dos efeitos dos estresses térmico foram avaliados a capacidade de retorno do material (homeostase) à condição controle(25°C).

Considerou-ser que o material sofreu um dano (tensão plástica) quando as plantas perderam a capacidade homeostática, todavia quando esta foi mantida considerou-se que as plantas apresentaram tolerância às variações térmicas.

Os experimentos foram analisados quanto ao retorno dos tratamentos a curto (24 horas) e longo prazo (21 dias) (homeostase) a apresentarem níveis de açúcar iguais ao controle de cada um.

4.2 Açúcares e Temperatura

4.2.1 Choque térmico a 5°C

O tratamento T1 apresentou inicialmente alteração nos níveis de açúcares solúveis totais mantendo-se esta alteração ao longo dos 21 dias de experimentação, demonstrando que o material não desenvolveu capacidade de homeostase diante ao choque térmico sofrido. (Figura 1). Porém, houve uma tendência de diminuição dos níveis de açúcar aos 21 dias, aproximando-se do controle.

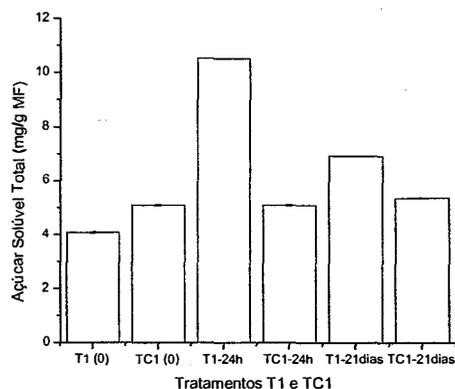


Figura 1 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 5°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura (onde: T1 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC1 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T1; T1-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC1-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T1-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC1-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

O tratamento T2 (2,5 mmol de Ca) sob 5°C, apresentou inicialmente teor de açúcar inferiores ao seu controle, todavia em curto prazo (24 horas) houve um aumento significativo neste teor, mas que não se manteve ao final dos 21 dias, voltando a apresentar valores inferiores ao controle (Figura 2).

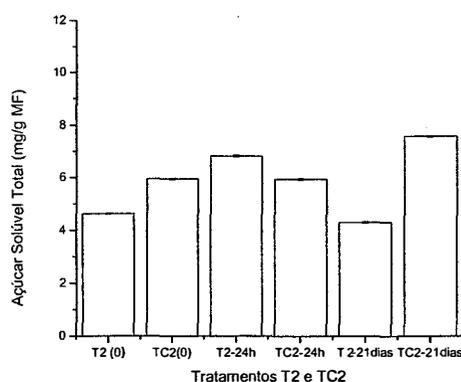


Figura 2 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 5°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura (onde: T2 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC2 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T2; T2-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC2-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T2-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC2-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Na Figura 3, o tratamento T3, após 24 horas não apresentou alteração nos teores de açúcares solúveis totais, demonstrando que o estresse sofrido pela variação de temperatura foi superado em curto prazo, mas aos 21 dias as diferenças entre os níveis de açúcar voltaram a ser muito distintos, demonstrando uma homeostase passageira do material.

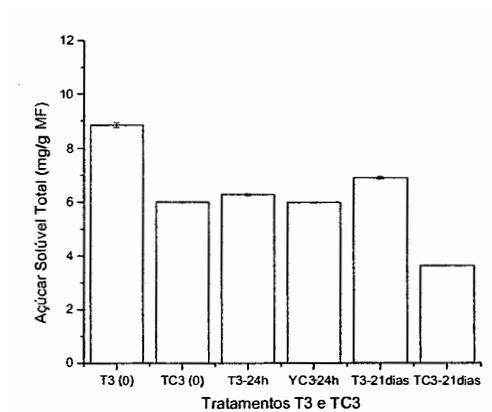


Figura 3 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 5°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura (onde: T3 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC3 (0) -o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T3; T3-24h – material analisado 24 horas após o choque térmico; TC3-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T3-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC3-21 dias –controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Na temperatura de 5°C o tratamento com adição de 10mmol de Ca, T4 e TC4, foi o que aparentemente sofreu menos os efeitos de estresse, mesmo apresentando alterações nos níveis de açúcar durante os 21 dias ao final foi o tratamento que menos expressou menores variações em relação a seus controles (Figura 4).

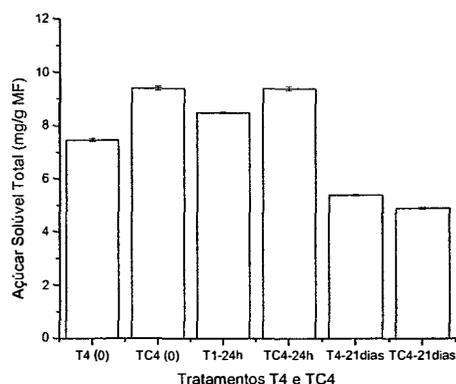


Figura 4 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 5°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T4 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC4 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T4; T4-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC4-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T4-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC4-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Os tratamentos submetidos à 5°C na sua totalidade, T1, T2, T3 e T4 sofreram alteração não reversíveis diante ao estresse térmico induzido. Entretanto, o tratamento que menos apresentou alteração foi o T4, que continha o dobro da quantidade usual de adição de Ca ao meio de cultura. Embora não possa se afirmar que este tratamento também não tenha sofrido nenhum tipo de injúria, apresentou alterações menos severas, mas não capacidade homeostática total. Já no tratamento T3, verificou-se homeostase passageira, em curto prazo, que não se manteve até o final da experimentação.

4.2.2 Choque térmico a 15°C

Na Figura 5, foi possível se notar que durante todo o período de experimentação, tanto em curto, quanto em longo prazo houve aumento no teor de açúcares solúveis totais, não demonstrando homeostase do material diante da variação de temperatura, principalmente após 21 dias.

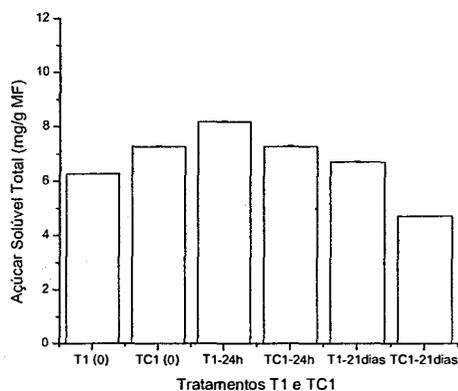


Figura 5 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 15°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura. (onde: T1 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC1 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T1; T1-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC1-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T1-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC1-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

A temperatura não afetou de forma significativa os teores de açúcar, mesmo considerando-se a maior diferença aos 21 dias, onde o controle apresentou maiores quantidades nos teores de açúcar (Figura6).

A quantidade de adição de Ca, 2,5 mmol, foi eficiente para estabilidade do material submetido à 15°C.

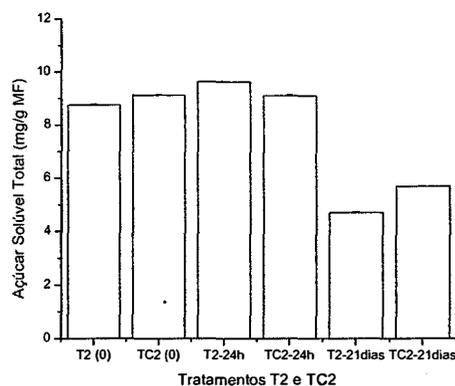


Figura 6 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 15°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T2 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC2 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T2; T2-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC2-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T2-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC2-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

O T3 (5 mmol de Ca) submetido a 15°C, embora imediatamente ter apresentado níveis inferiores ao seu controle, após 21 dias de cultivo manteve o mesmo teor de açúcar, demonstrando que a variação de temperatura a qual as plantas foram submetidas, não apresentaram estresse em longo prazo, T3 apresentou homeostase (Figura7).

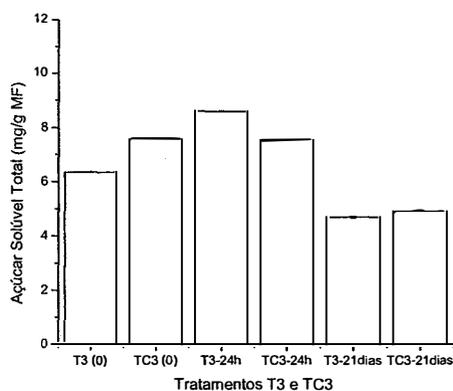


Figura 7 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 15°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde T3 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC3 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T3; T3-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC3-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T3-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC3-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Mesmo considerando-se aumento significativo nos teores de açúcar em curto prazo, após 21 dias de cultivo, as plantas apresentaram níveis baixos de açúcar, indicando recuperação do material (Figura 8).

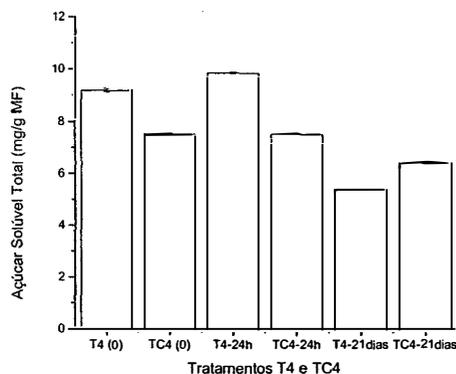


Figura 8 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 15°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T4 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC4 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T4; T4-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC4-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T4-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC4-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Os tratamentos submetidos à temperatura de 15°C já apresentaram respostas diferentes aos submetidos a choque de 5°C, no caso desta fase do experimentos os tratamentos T2, T3 e T4, apresentaram fatores de recuperação esperado, homeostase em longo prazo, chegando ao longo dos 21 dias apresentando níveis de açúcar próximos aos seus controles.

4.2.3 Choque térmico a 35°C

O tratamento T1 (Figura 9) submetidos à 35°C, apresentou inicialmente pequena alteração nos teores de açúcar, mas apresentou níveis drasticamente superiores a TC1 em

curto prazo após o choque, demonstrando claramente estresse. Ao final dos 21 dias os teores de açúcar em T1 diminuíram, aproximando-se dos níveis em TC1, demonstrando então recuperação do material, capacidade de homeostase em longo prazo.

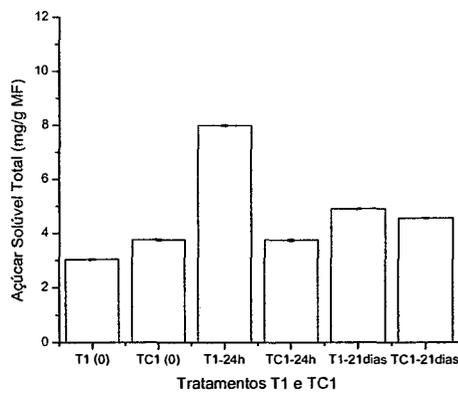


Figura 9 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 35°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura. (onde: T1(0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC1 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T1; T1-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC1-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T1-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC1-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Em T2 (Figura 10), os níveis de açúcar sofrem durante todo o processo pequenas alterações mas, mesmo considerando-se estas alterações, as plantas não apresentaram homeostase total. Todavia, uma vez que após os 21 dias da fase de recuperação os teores de açúcares solúveis foram menores que seu controle, podemos considerar que o material não sofreu danos em longo prazo.

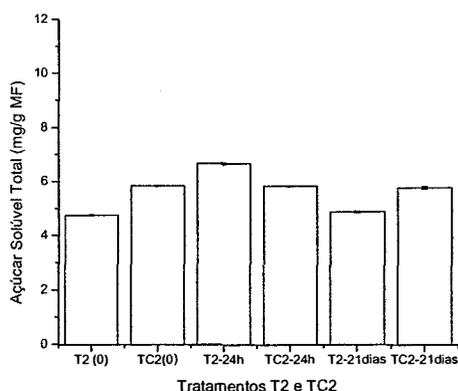


Figura 10 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 35°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T2 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC2 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T2; T2-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC2-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T2-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC2-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Como no caso do tratamento T2, as plantas submetidas aos tratamentos T3 e TC3 conseguiram atingir ao final dos 21 dias fatores relativamente próximos o que demonstrou que o material novamente apresentou capacidade de homeostase após o choque térmico durante todo o período de experimentação (Figura 11).

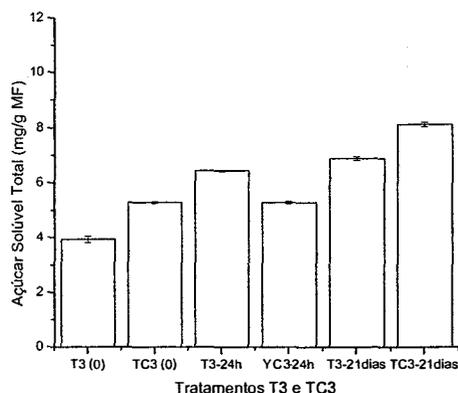


Figura 11 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 35°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura.(onde: T3 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC3 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T3; T3-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC3-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T3-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC3-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Analisando o tratamento T4 (Figura 12), notou-se que os níveis de açúcar apresentados por este foram, durante todo o período, superior aos apresentados por TC4, inicialmente apresentando alteração maior, e após 24 horas e 21 dias, alterações pouco menores, mas não chegando a total recuperação, demonstrando fatores irreversíveis de estresse.

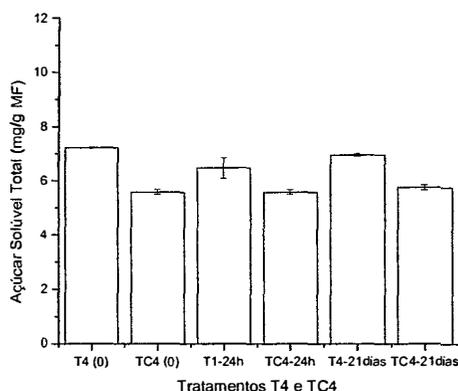


Figura 12 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 35°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T4 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC4 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T4; T4-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC4-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T4-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC4-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

As doses de Ca adicionadas aos tratamentos T1, T2e T3 foram suficientes para manter a estabilidade dos materiais. Os resultados apresentados nas Figura 12, indicaram que a quantidade mais elevada de adição de Ca prejudicou a homeostase da planta.

4.2.4 Choque térmico a 45°C

Imediatamente após o choque térmico de 45°C, T1 apresentou grande aumento no teor de açúcar, comparado com TC1. Embora fosse observada uma diminuição no teor de açúcar em curto prazo, com 21 dias de cultura a planta volta a apresentar teor de

açúcar superior ao seu controle, indicando danos na capacidade homeostática da planta (Figura 13).

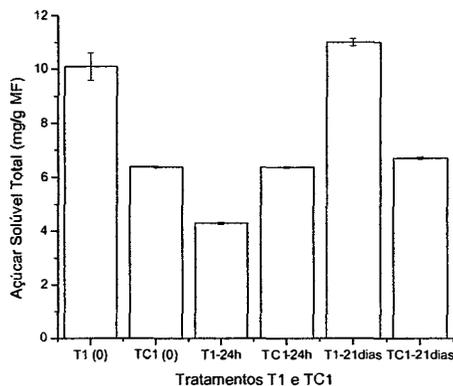


Figura 13 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 45°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura. (onde T1 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC1 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T1; T1-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC1-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T1-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC1-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Como no tratamento T1, T2 apresentou o mesmo padrão de variação dos teores de açúcares, indicando novamente que a temperatura de 45°C afetou a capacidade de recuperação do material (Figura 14).

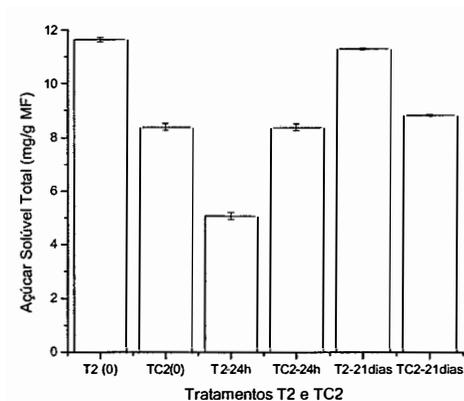


Figura 14 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 45°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T2 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC2 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T2; T2-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC2-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T2-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC2-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

No tratamento T3, os teores de açúcar não foram severamente afetados em relação à seus controles (Figura 15), indicando ao final do período de experimentação uma boa capacidade de recuperação do material.

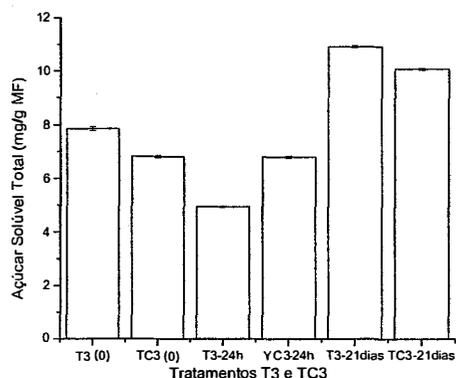


Figura 15 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 45°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T3 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC3 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T3; T3-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC3-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T3-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC3-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Os resultados obtidos no tratamento T4 indicaram, como em T3, capacidade de recuperação do material ao longo dos 21 dias de experimentação (Figura 16).

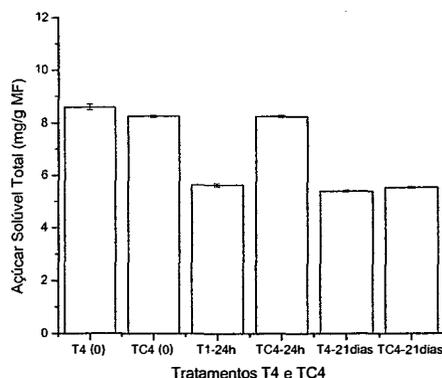


Figura 16 – Quantificação de açúcares solúveis totais em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 45°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T4 (0) - quantificação de açúcares solúveis totais imediatamente após o choque térmico; TC4 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T4; T4-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC4-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T4-21dias - quantificação de açúcares solúveis totais realizada 21 dias após o choque térmico e, TC4-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

O que pode-se notar na temperatura de 45°C, somente os tratamentos com maior adição de Ca ao meio de cultura mantiveram capacidade de homeostase do material, mesmo considerando-se efeitos de estresse em curto prazo, que foram reversíveis ao longo do período de experimentação.

De acordo com Guy (1990), os carboidratos: sacarose, rafinose e sorbitol são os primeiros crioprotetores, encontrados na planta após um estresse térmico. Desse, a sacarose é o mais encontrado em plantas tolerantes à baixa temperatura, onde seus níveis podem aumentar até 10 vezes, durante o estresse. O acúmulo de sacarose pode ter decorrido do aumento da atividade enzimática da sintase da sacarose fosfato, ou pela redução da translocação deste açúcar, em função da redução da taxa metabólica das

plantas, expostas à baixa temperatura. Arruda (2000), verificou que nas regiões de calos, onde o cálcio foi mais acumulado, os teores de açúcares foram superiores.

O aumento da concentração de açúcares solúveis totais freqüentemente está relacionado com a manutenção do turgor das células. Além disso, deve estar relacionado à manutenção do estado energético das plantas sob estresse, que têm um aumento na demanda por metabolização de carboidratos (Hare et al.³, citado por Souza, 2001).

O aumento ou diminuição nos níveis de açúcar diante do estresse térmico, além das variações de concentrações de Ca ao meio, levaram o material a apresentar ou não homeostase, no caso nas baixas temperaturas os tratamentos devem conter maiores quantidades de Ca adicional ao meio do que os submetidos à temperaturas mais elevadas, que demonstraram menor necessidade de adição de Ca para manutenção da homeostase do material.

4.3 Prolina e Temperatura

4.3.1 Choque térmico a 5°C

Na Figura 17, pode-se observar que não houve alteração nos níveis de prolina imediatamente após o choque térmico mas, passadas 24 horas o material apresentou diminuição nos teores de prolina, provavelmente devido a uma redução no metabolismo a baixa temperatura. Todavia no material submetido à temperatura de 25°C observou-se um acúmulo de prolina, indicando efeito do estresse em longo prazo.

³ HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, v. 21, p. 535-553, 1998.

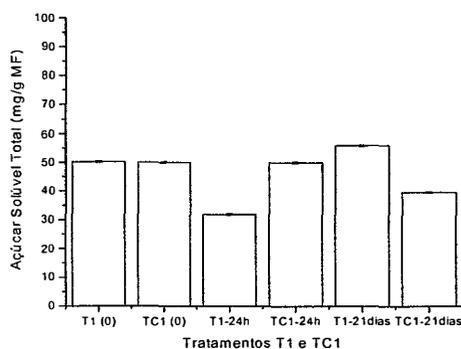


Figura 17 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 5°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura.(onde: T1 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC1 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T1; T1-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC1-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T1-21dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC1-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

As plantas do tratamento T2 submetidas à 5°C sempre apresentaram teores de prolina inferiores à seus controles ao longo do experimento. Uma vez que considera-se o aumento do teor de prolina (Figura 18) como indicador de estresse, este ficou difícil determinar se sofreu de fato um dano ou a temperatura não foi suficiente para desencadear respostas das plantas.

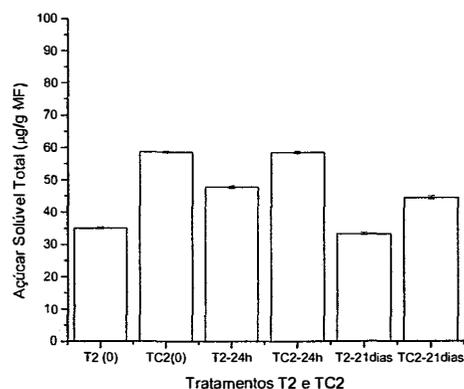


Figura 18 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 5°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T2 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC2 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T2; T2-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC2-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T2-21dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC2-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

As variações do teor de prolina observado na tratamento T3 (Figura19), seguiram a mesma tendência que no tratamento T2, isto é, os níveis de prolina foram durante todo o período de experimentação inferiores ao controle.

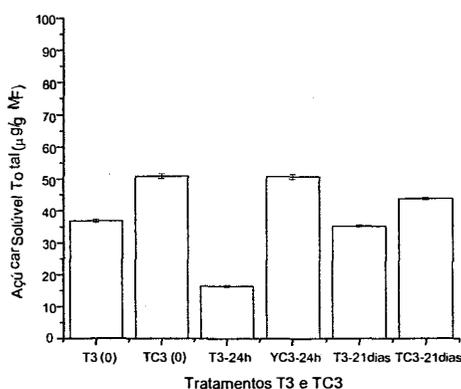


Figura 19 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 5°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T3 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC3 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T3; T3-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC3-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T3-21dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC3-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Embora esse padrão de resposta tenha sido semelhante aos tratamentos T2 e T3, percebe-se uma menor variação entre os valores, sugerindo uma dose mais elevada de Ca tenha levado a uma maior estabilidade do material (Figura 20).

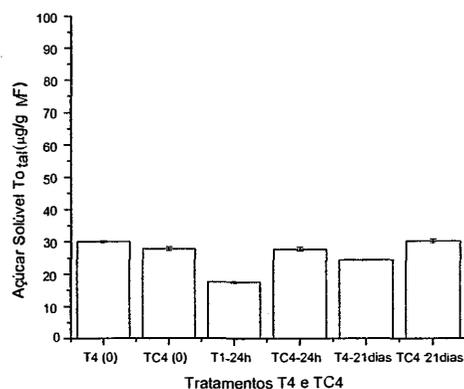


Figura 20 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 5°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.(onde: T4 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC4 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T4; T4-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC4-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T4-21dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC4-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Em todos os tratamentos os efeitos do estresse térmico foram irreversíveis, não demonstrando em nenhum caso capacidade de recuperação dos materiais, homeostase, somente o tratamento T4 apresentou resistência imediata, não mantidas em curto e longo prazo de recuperação. Todavia o tratamento T4 veio a apresentar mais estabilidade do material.

4.3.2 Choque térmico de 15°C

No T1, a temperatura de 15°C induziu redução nos teores de prolina imediatamente após o choque térmico e após 24 horas de fase de recuperação. Entretanto,

ao final do período de 21 dias de experimento observou-se um acúmulo de prolina (Figura 21).

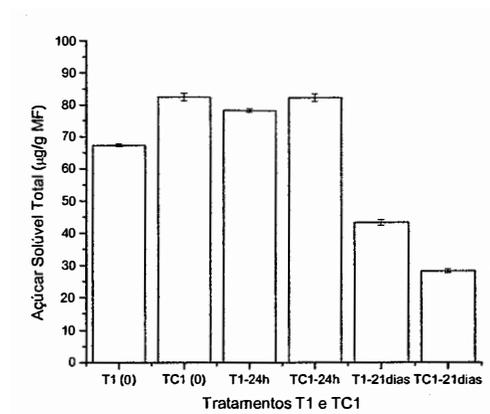


Figura 21 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 15°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura. (onde: T1 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC1 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T1; T1-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC1-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T1-21dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC1-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

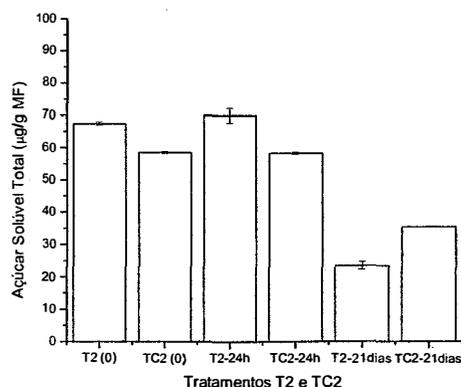


Figura 22 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 15°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T2 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC2 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T2; T2-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC2-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T2-21dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC2-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

As proporções em T3 e TC3 se mantiveram próximas durante os períodos iniciais e em médio prazo, logo, ao final dos 21 dias o material apresentou maior alteração entre os níveis de prolina, não demonstrando, também nesta variação de temperatura, homeostase do material em análise, evidenciando os efeitos irreversíveis da diminuição de temperatura (Figura 23).

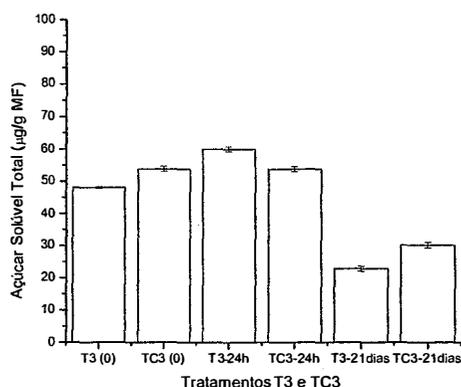


Figura 23 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 5°C com adição de 15,0 mmol de Ca ao meio de cultura.(onde: T3 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC3 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T3; T3-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC3-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T3-21 dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC3-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Diferentemente, nos tratamentos T2, T3 e T4 observou-se uma redução dos teores de prolina ao final do experimento (Figuras 22, 23 e 24). Porém o T4 apresentou uma redução do teor de prolina já a partir de 24 horas da fase de recuperação, o que não aconteceu com os tratamentos T2 e T3.

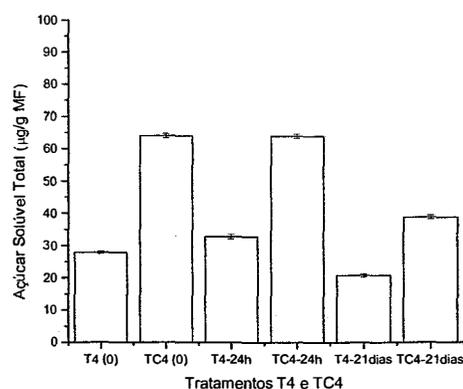


Figura 24 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 15°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T4 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC4 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T4; T4-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC4-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T4-21dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC4-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Na temperatura de 15°C, pode-se observar que adição de Ca ao meio de cultura foi favorável quanto a manutenção de baixos níveis de prolina, sendo somente no tratamento isento de adição de Ca observou-se acúmulo de prolina.

4.3.3 Choque térmico a 35°C

O tratamento T1 (Figura 25) apresentou aumento no nível de prolina, sendo que, tal alteração se manteve até o final dos 21 dias, não apresentando homeostase em nenhum momento, demonstrando o efeito irreversível do estresse.

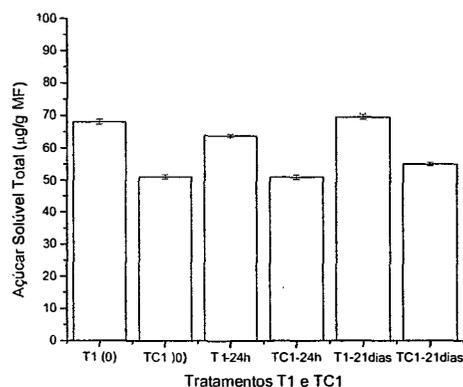


Figura 25 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 35°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura. (onde: T1 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC1 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T1; T1-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC1-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T1-21dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC1-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

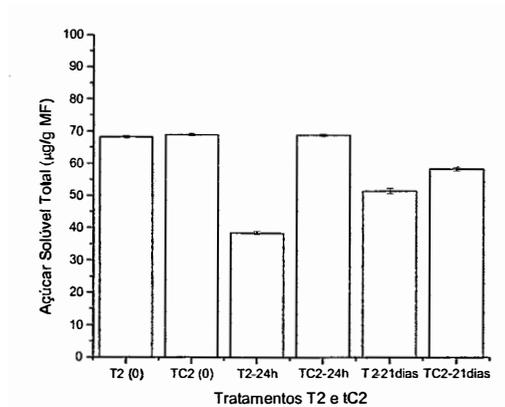


Figura 26 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 35°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T2 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC2 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T2; T2-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC2-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T2-21 dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC2-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Em T3 e TC3, (Figura 27), as alterações entre os níveis de prolina apresentados pelos dois tratamentos não foram muito significativas, mas mantém ao longo do período, diferenças entre estes níveis, demonstrando durante todo o processo que houve realmente efeito irreversível diante da variação de temperatura, por não ter apresentado em nenhum momento homeostase do material.

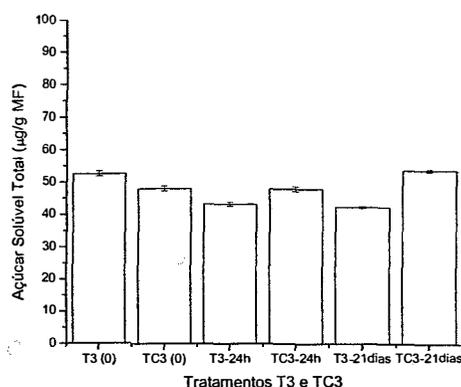


Figura 27 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 35°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T3 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC3 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T3; T3-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC3-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T3-21dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC3-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Nos tratamentos T2, T3 e T4, não foram observadas alterações nos níveis de prolina das plantas submetidas à 35°C. Ao final do período de recuperação todos os tratamentos apresentaram redução nos níveis de produção em relação à seus controles (Figuras 26, 27 e 28).

Esses resultados sugerem que a menor dosagens de Ca adicionados ao meio de cultura, já foi suficiente para minimizar os efeitos do estresse observado em T1.

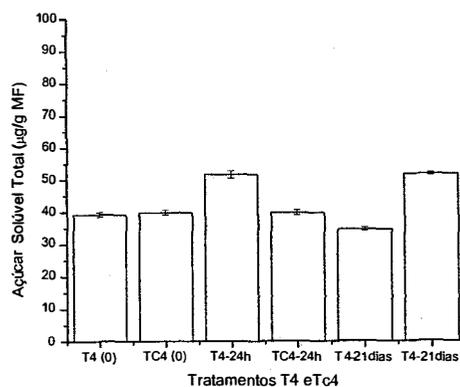


Figura 28 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 35°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T4 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC4 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T4; T4-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC4-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T4-21dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC4-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

4.3.4 Choque térmico a 45°C

As plantas submetidas ao tratamento T1 (Figura 29) sem adição de Ca ao meio de cultura, apresentaram durante todo o período de experimentação teores de prolina inferiores a seus controles.

Já as plantas do tratamento T2 (Figura 30) apresentaram maior estabilidade em relação à alteração no nível de prolina, indicando que esta dosagem de Ca foi favorável para manutenção da homeostase das plantas.

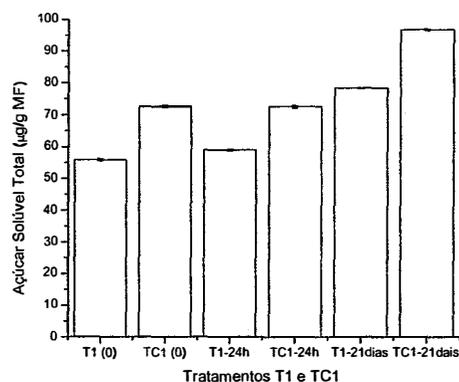


Figura 29 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 45°C isento de fonte externa de Ca ao meio de cultura. (onde: T1 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC1 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T1; T1-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC1-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T1-21dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC1-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

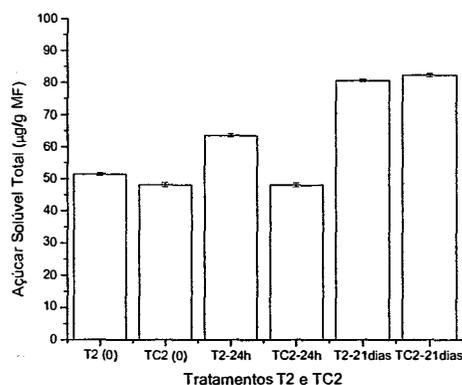


Figura 30 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 45°C com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T2 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC2 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T2; T2-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC2-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T2-21 dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC2-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

No tratamento com a quantidade usual de adição de Ca ao meio de cultura (5 mmol de Ca), T3 apresentou inicialmente teores superiores ao seu controle, diminuindo estes níveis em curto prazo (24 horas após o choque), mantendo-se mais elevados do que o controle. Porém ao final do período de 21 dias apresentou nível de prolina inferior (Figura 31).

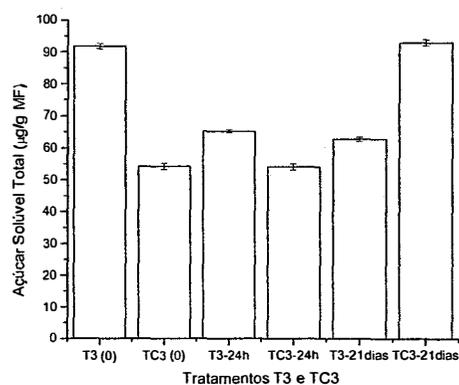


Figura 31 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 45°C com adição de 5,0 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T3 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC3 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T3; T3-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC3-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T3-21 dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC3-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

O tratamento T4, à temperatura de 45°C, apresentou inicialmente teores de prolina inferiores a seus controles. Porém, ao 21 dias de cultivo apresentou acúmulo de prolina em relação a seu controle (Figura 32).

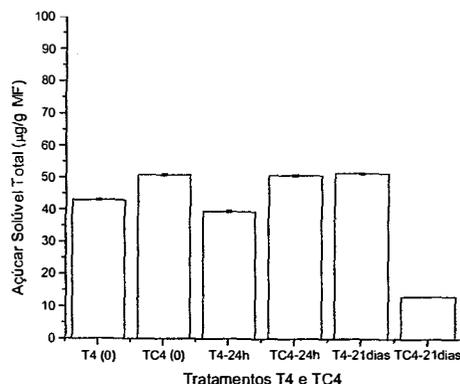


Figura 32 – Quantificação de prolina em plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 45°C com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura. (onde: T4 (0) - quantificação de prolina imediatamente após o choque térmico; TC4 (0) - o tratamento constantemente mantido à 25°C (temperatura controle), e com o mesmo tempo de cultivo de T4; T4-24h - material analisado 24 horas após o choque térmico; TC4-24h - é o controle do material analisado 24 horas após o choque térmico; T4-21dias - quantificação de prolina realizada 21 dias após o choque térmico e, TC4-21 dias – controle do material quantificado 21 dias após o choque, este material, como em todos os casos apresenta seu controle com o mesmo período de cultivo do material que foi submetido ao choque térmico).

Na temperatura de 45°C, somente o tratamento T2 apresentou homeostase em longo prazo, sendo que os outros tratamentos tanto imediatamente após o choque térmico, quanto em curto e longo prazo não apresentaram recuperação do material.

De acordo com Souza (2001), plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas à 0°C, demonstraram um aumento significativo no conteúdo de prolina, a homeostase da síntese deste aminoácido foi seriamente afetada, sugerindo alterações em suas vias metabólicas não reversíveis após o período de recuperação. Já as plantas submetidas à 41°C as alterações de síntese de prolina foram revertidas após o período de recuperação, os dados indicaram que as alterações no conteúdo de prolina podem ter sido eficazes para a manutenção da homeostase em *Eucalyptus grandis*. O experimento realizado neste

trabalho apresentou teores de prolina inferiores na maioria dos tratamentos nas baixas temperaturas demonstrando resultados diferentes dos obtidos por Souza (2001). Quanto aos teores de prolina nos tratamentos submetidos a temperaturas de 35°C, estes apresentaram teores de prolina inferiores aos seus controles na maioria dos tratamentos. Quanto à temperatura de 45°C, existiu aumento e diminuição nos teores de prolina nos diferentes tratamentos. Somente o tratamento contendo 2,5 mmol de Ca apresentou homeostase do material no final do período.

4.4 Taxa de Crescimento Relativo (TCR)

4.4.1 Temperatura a 5°C

De acordo com o gráfico apresentado (Figura 33) e a tabela de dados obtidos (Tabela 2) pode-se afirmar que quanto a estabilidade do material submetido à temperatura de 5°C, o tratamento T4, que continha 10 mmol de adição de Ca ao meio de cultura foi mais estável por apresentar desvio padrão menor do que os outros tratamentos, já em relação à média da taxa de crescimento r_{relativo} o tratamento T1 foi superior, porém apresentou um forte decréscimo da TCR. Assim de uma forma geral as doses mais elevadas de Ca foram mais favoráveis às plantas sob 5°C.

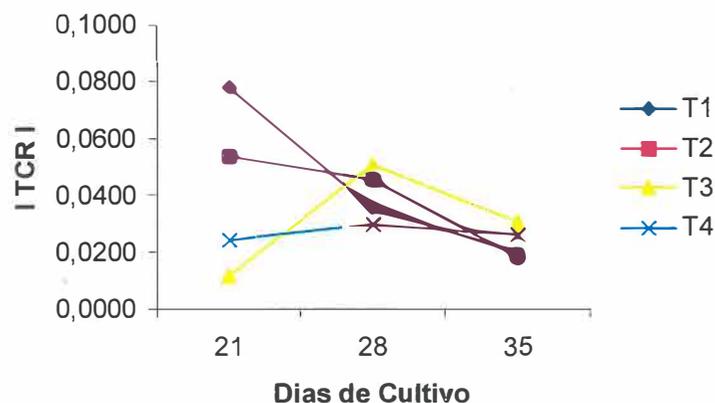


Figura 33 – Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de todos tratamentos com variação nas concentrações de adição de Ca ao meio de cultura, submetidos à temperatura de 5°C. (T1 = tratamento isento de adição de Ca ao meio de cultura; T2 = tratamento com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura; T3 = tratamento com adição de 5,0 mmol de adição de Ca ao meio de cultura e, T4 = tratamento com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.).

Tabela 2. Taxa de crescimento relativo de cada tratamento após o choque térmico até aos 35 dias de cultivo, com variação de temperatura de 5°C.

Tratamentos	TCR–21 dias	TCR–28 dias	TCR–35 dias	Média TCR	Desvio Padrão
T1	0,0780	0,0354	0,0200	0,0445	0,0300
T2	0,0538	0,0455	0,0182	0,0392	0,0186
T3	0,0116	0,0506	0,0307	0,0309	0,0195
T4	0,0243	0,0297	0,0262	0,0267	0,0028

4.4.2 Temperatura 15°C

Na temperatura de 15°C (Figura 34 e Tabela 3), pode-se notar que quanto à estabilidade de crescimento do material, o tratamento T1 foi satisfatório por apresentar o menor desvio padrão. Quanto a maior média geral de TCR foi observado no tratamento

T2, porém a TCR decresce constantemente. Tendência oposta foi observada no tratamento T3 que apresentou aumento na TCR durante o período de cultivo

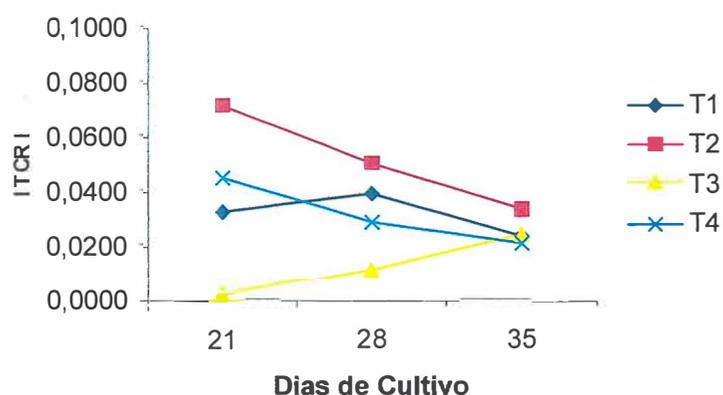


Figura 34 – Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de todos tratamento com variação nas concentrações de adição de Ca ao meio de cultura, submetidos à temperatura de 15°C. (T1 = tratamento isento de adição de Ca ao meio de cultura; T2 = tratamento com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura; T3 = tratamento com adição de 5,0 mmol de adição de Ca ao meio de cultura e, T4 = tratamento com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.).

Tabela 3. Taxa de crescimento relativo de cada tratamento após o choque térmico até aos 35 dias de cultivo, com variação de temperatura de 15°C.

Tratamentos	TCR–21 dias	TCR–28 dias	TCR–35 dias	Média TCR	Desvio Padrão
T1	0,0330	0,0396	0,0240	0,0322	0,0078
T2	0,0715	0,0506	0,0339	0,0520	0,0188
T3	0,0021	0,0116	0,0248	0,0128	0,0114
T4	0,0454	0,0291	0,0215	0,0320	0,0123

4.4.3 Temperatura a 25°C

Na temperatura de 25°C, o tratamento T1 apresenta maior estabilidade do material, considerando seu valor de desvio padrão inferior aos demais tratamentos, mas neste caso deve-se observar juntamente com isso o valor do crescimento absoluto que

neste caso apresenta média de TCR aproximadamente zero. O tratamento T4 apresentou estabilidade semelhante ao do tratamento T1, porém apresentou aumento na taxa de crescimento ao final do experimento.

Embora o tratamento T3 possa ter apresentado média geral de TCR mais elevada, observou-se decréscimo de crescimento constantemente, levando-se a considerar o tratamento T4 como sendo o mais adequado para o crescimento nesta temperatura (Figura 35 e Tabela 4).

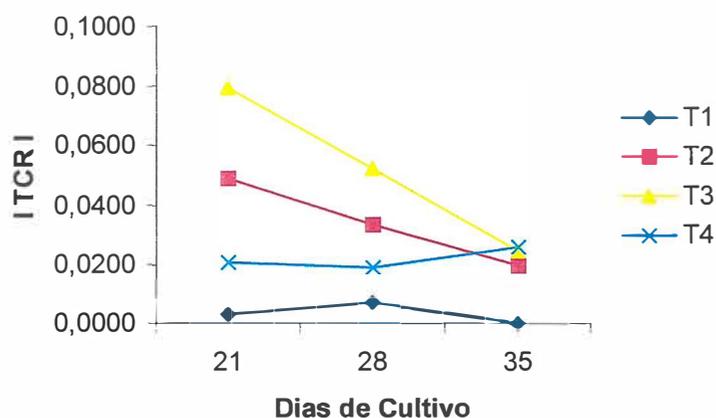


Figura 35 – Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de todos tratamentos com variação nas concentrações de adição de Ca ao meio de cultura, submetidos à temperatura de 25°C. (T1 = tratamento isento de adição de Ca ao meio de cultura; T2 = tratamento com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura; T3 = tratamento com adição de 5,0 mmol de adição de Ca ao meio de cultura e, T4 = tratamento com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.).

Tabela 4. Taxa de crescimento relativo de cada tratamento após o choque térmico até aos 35 dias de cultivo, com variação de temperatura de 25°C.

Tratamentos	TCR-21 dias	TCR-28 dias	TCR-35 dias	Média TCR	Desvio Padrão
T1	0,0031	0,0071	0,0000	0,0034	0,0035
T2	0,0491	0,0337	0,0200	0,0343	0,0146
T3	0,0796	0,0526	0,0250	0,0524	0,0273
T4	0,0209	0,0193	0,0262	0,0221	0,0036

4.4.4 Temperatura a 35°C

Por ter apresentado desvio padrão inferior ao demais (Figura 36 e Tabela 5), o tratamento T2 foi o que mais apresentou estabilidade do material sob cultivo, além de apresentar a maior TCR aos 35 dias de cultivo, sua média geral só foi superada pelo tratamento T1, que por sua vez apresentou tendência de decréscimo da TCR em relação ao tratamento T2.

Já os tratamentos com maiores níveis de Ca, apresentaram forte redução na TCR final.

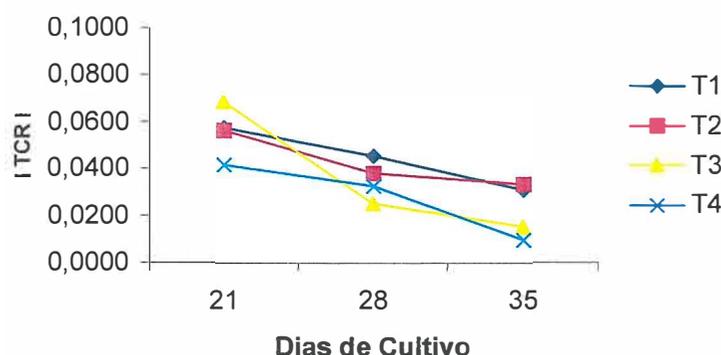


Figura 36 – Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de todos tratamento com variação nas concentrações de adição de Ca ao meio de cultura, submetidos à temperatura de 35°C. (T1 = tratamento isento de adição de Ca ao meio de cultura; T2 = tratamento com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura; T3 = tratamento com adição de 5,0 mmol de adição de Ca ao meio de cultura e, T4 = tratamento com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.).

Tabela 5. Taxa de crescimento relativo de cada tratamento após o choque térmico até aos 35 dias de cultivo, com variação de temperatura de 35°C.

Tratamentos	TCR–21 dias	TCR–28 dias	TCR–35 dias	Média TCR	Desvio Padrão
T1	0,0572	0,0453	0,0308	0,0445	0,0132
T2	0,0560	0,0379	0,0334	0,0424	0,0120
T3	0,0682	0,0253	0,0154	0,0363	0,0281
T4	0,0415	0,0324	0,0098	0,0279	0,0163

4.4.5 Temperatura a 45°C

Pode-se verificar que o tratamento T1 apresentou desvio padrão menor do que os outros tratamentos (Figura 37 e Tabela 6), demonstrando maior estabilidade do material à 45°C, mesmo considerando-se a baixa produção final, pelo fato de todos os tratamentos apresentarem ao final do período de experimentação baixa produção, já quanto ao crescimento relativo o tratamento T3 foi superior aos demais, pela maior média geral de TCR.

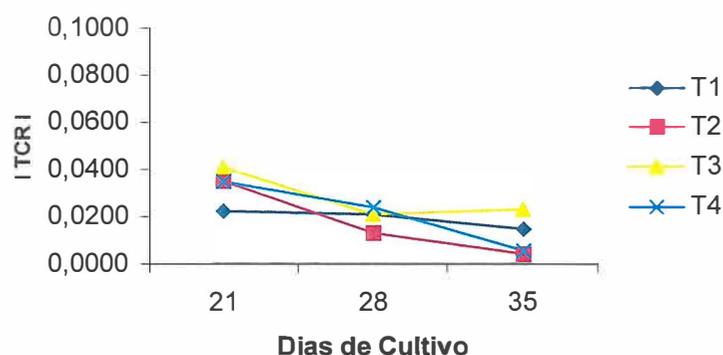


Figura 37 – Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de todos os tratamentos com variação nas concentrações de adição de Ca ao meio de cultura, submetidos à temperatura de 45°C. (T1 = tratamento isento de adição de Ca ao meio de cultura; T2 = tratamento com adição de 2,5 mmol de Ca ao meio de cultura; T3 = tratamento com adição de 5,0 mmol de adição de Ca ao meio de cultura e, T4 = tratamento com adição de 10,0 mmol de Ca ao meio de cultura.).

Tabela 6. Taxa de crescimento relativo de cada tratamento após o choque térmico até aos 35 dias de cultivo, com variação de temperatura de 45°C.

Tratamentos	TCR-21 dias	TCR-28 dias	TCR-35 dias	Média TCR	Desvio Padrão
T1	0,0224	0,0211	0,0148	0,0194	0,0041
T2	0,0351	0,0133	0,0043	0,0176	0,0158
T3	0,0411	0,0210	0,0232	0,0284	0,0110
T4	0,0348	0,0239	0,0057	0,0215	0,0147

Conforme Slocum & Roux (1983), a planta tem um incremento de crescimento maior nas idades iniciais de desenvolvimento (períodos de cultivo), até atingir um ponto de máximo incremento. Após este ponto, os incrementos de crescimento são decrescentes, daí a justificativa dos gráficos demonstrarem aspectos decrescentes após o choque térmico pois, no período das análises as plantas já contavam com 14 dias de cultivo, quando este sofreu as variações de temperatura, continuando por mais 21 dias totalizando 35 dias de cultivo, entrando na fase de diminuição de crescimento.

As Taxas de Crescimento Relativo sofrem influência direta das condições do meio em que a planta cresce (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 & Wayne, 1985; Gougler & Evans, 1981).

De acordo com Langer (2000), as Taxas de Crescimento Relativo decaem em todos os tratamentos a partir do 21º dia de cultivo independente da dosagem de Ca adicionada ao meio, mas comparando-se as dosagens de Ca utilizadas tanto neste trabalho 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 diminuição na TCR das plantas.

Se considerarmos que a cultura se mantém crescendo o 21 dias de cultivo, elegemos os melhores tratamentos em relação ao crescimento relativo médio da cultura como sendo T1 à 5°C; T2 à 15°C; T3 à 25°C; T3 à 35°C e, T3 também à 45°C, já se o cultivo for mantido até o 28º dia os tratamentos adequados serão T3 à 5°C; T2 à 15°C; T3 à 25°C; T1 à 35°C e, T4 à 45°C, mas, se mantidos até o 35º dia de cultivos os melhores tratamentos quanto ao crescimento relativo médio seriam T3 à 5°C; T2 à 15°C; T4 à 25°C; T2 à 35°C e, T3 e 45°C.

5 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que o cálcio influencia na resposta da planta à variação de temperatura, contribuindo para a manutenção da estabilidade (homeostase).

Os resultados obtidos indicaram diferenças das doses de Ca sob as respostas das plantas a temperaturas altas e baixas. As plantas submetidas a baixas temperaturas, de uma forma geral, exigiram maior concentração de Ca para a manutenção de sua homeostase do que as plantas submetidas às temperaturas mais elevadas.

Para efeito prático, pode-se sugerir para o cultivo de *Eucalyptus grandis* “in vitro”, doses altas, 10 mmol, para 5°C; doses de média a alta para 15°C, entre 5 e 10 mmol, e para temperaturas entre 35 e 45°C a dosagem usual do meio JADS, 5 mmol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERMAN, K. E. O.; NICHOLLS, D. G. Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial calcium transport. **Annual Review Physiology Biochemistry Pharmacology**, v.18, p. 149-201, 1983.
- ARRUDA, S. C. C. Efeito do cálcio na indução de embriogênese somática de *Eucalyptus urophylla*. Piracicaba, 2000. 74p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- ASPINALL, D., PALEG, G. Proline accumulation; physiological aspects. In: PALEG, G., ASPINALL, D. **The physiology and biochemistry of drought resistance in plants**. New York:: Academic Press, 1981.p. 205-259.
- BORLE, A. B. Control, modulation and regulation of cell calcium. **Annual Review Physiology Biochemistry Pharmacology**, v. 90, p.130-169, 1981.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CORREIA, D. Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. Em meio de cultura líquido e sólido. Piracicaba, 1993. 113p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- EKLUND, L.; ELIASSON, L. Effects of calcium ion concentration on cell wall synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v.41, p. 863-867, 1990.
- EPSTEIN, E. **Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas**. São Paulo: EDUSP, 1975. 344p.
- FAYAD, J. A., Absorção de nutrientes, crescimento e produção do tomateiro cultivado em condições de campo e estufa. Viçosa, 1998. 81 p. (M.S.) – Universidade Federal de Viçosa.
- FEIJO, J. A., MALHO, R.; OBERMEYER, G. Ion dynamics and its possible role during in vitro pollen germination and tube growth. **Protoplasma**, v.187, p. 155-167, 1995.
- FOSKET, D. E. **Plant growth and development: a molecular approach**. New York: Academic Press, 1994. 580p.
- GEORGE, E. F.; PUTTOCK, D. J. M.; GEORGE, H. J. **Plant culture media**. Edington: British Library, 1988. 2v.
- 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 metabolism. **Annual Review Plant Physiology Plant Biology**, v. 41, p. 187-223, 1990.

- GROSSI, F. Adequação nutricional do meio de cultura para crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus saligna* SMITH *in vitro*, procedência Itatinga. Piracicaba, 1995, 125p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- HEPLER, P. K.; WAYNE, R. O. Calcium and plant development. **Annual Review of Plant Physiology.**, v.36, p.397-439, 1995.
- HIGASHI, E. N. Diagnose de deficiência de nutrientes minerais em três híbridos de *Eucalyptus* spp. cultivados *in vitro*. Piracicaba, 1996. 90p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis.** London: Edward Arnold., 1982. 248p.
- KAUFFMAN, S. A. **The origins of order.** New York: Oxford University Press, 1993. 709 p.
- KOSTER, K. L., LYNCH, D. V. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. **Plant Physiology.**, v.98, p. 108-113, 1992.
- LANGER, M. Estudos e análises dos efeitos do cálcio sobre o crescimento inicial de híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro*, Piracicaba, 2000. 101p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal.** Trad. de C. H. B. A. Prado. São Carlos: RiMa, 2000. 531p.

- LEE, J. S.; MULKEY, T. L.; EVANS, M. L. Inhibition of polar calcium movement and gravitropism in roots treated with auxin-transport inhibitors. **Planta**, v. 160, p. 536-543, 1984.
- LEVITT, J. **Response of plants to environmental stresses**. New York: Academic Press, 1972. 235p.
- LYONS, J. M. Chilling injury in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.24, p.445-466, 1973.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 154p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.
- MALAVOLTA, E.; HAAD, H. P.; MELLO, F. A. F.; BRASIL SOBRINHO, M. O. M. **Nutrição mineral e adubação de plantas cultivadas**. São Paulo: Ed. Pioneira, 1974. 752p.
- MALHO, R.; TREWAVAS, A. Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. **Plant Cell**, v.8, p.1935-1949, 1996.
- MARMÉ, D. The role of calcium in the regulation of plant cellular metabolism. In: GERDAY, Ch.; GILLES, R.; BOLIS, L. (Ed.) **Calcium and calcium binding proteins**. Berlin: Spring-Verlag, 1988. p. 201-208.

- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1986, 674p.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. Bern: International Potash Institute, 1987. 687p.
- McCOWN, B. H.; SELLMER, J. C. General media and vessels suitable for woody plant culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.) **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. cap. 2, v.2, p.4-16.
- NOBEL, P. S. **Physicochemical and environmental plant physiology**. San Diego: Academic Press, 1991. 635p.
- PALTA, J. P. Stress interactions at the cellular and membrane levels. **Horticultural Science**, v.25, n.11, p. 1377-1381, 1990.
- PENEL, L.; GREPPIN, H. Effects of calcium on subcellular distribution of peroxidases. **Phytochemistry**, v.18, p.29-33, 1979.
- PEREZ, S. C. J. G. A.,; MORAES, J. A. P. V. de. Influência da temperatura, da interação temperatura – giberelina e do estresse térmico na germinação de *Prosopis juliflora* (SW). D.C. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** v.2, n.1, p. 41-53. 1990.
- SALISBURY, F. C.; ROSS, C. **Plant physiology**. 4. ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 682p.

SIEBENEICHLER, S. C., Alterações Bioquímicas e Fisiológicas Induzidas por Baixa Temperatura em Feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L.). Viçosa, 1996. 55 p.- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

SILVEIRA, R. L. V. A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N. **Curso de treinamento e capacitação em nutrição mineral e adubação de *Eucalyptus***: minijardim clonal, viveiro e campo. Piracicaba: IPEF, 2000. 42 p.

SILVEIRA, R. L. V. A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; MOREIRA, A. Avaliação do estado nutricional do *Eucalyptus*: Diagnose visual, foliar e suas interpretações. (compact disc) In: SIMPÓSIO DE FERTILIZAÇÃO E NUTRIÇÃO FLORESTAL, Piracicaba: IPEF, 1999.

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.

SOUZA, G. M. Contribuição para um conceito sistêmico de estresse em plantas: integração, hierarquia, estabilidade. Rio Claro, 2001. 92p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

TAWFIK, A. A. , KLEINHENZ, M. D.; PALTA, J. P. Application of calcium and nitrogen for mitigating heat stress effects on potatoes. **American Potato Journal** v.73, n. 6, p.26-32, 1996.

TEASDALE, R. D. Micronutrientes. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.) **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht: Martinus Mijhoff, 1987. v.1, p.17-49.

TING, I. P. **Plant physiology**. Riverside: University of California, 1982. 642p.

- WILLIAMSON, R. E.; ASHLEY, C. C. Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in the alga *chara*. **Nature**, v. 296, p. 647-650, 1982.
- WITHERS, L. A., KING, P. J. Proline: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. **Plant Physiology**, v.64, p.675-678, 1979.
- WOODS, C. M., POLITO, V. S.; REID, M. S. Chilling stress in plant cells. II Redistribution of intracellular calcium. **Protoplasma**, v. 121, p. 17-27, 1984.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-515, 1954..
- YORDANOV, I. Response of photosynthetic apparatus to temperature stress and molecular mechanisms of its adaptations. **Photosynthetica**, v.26, n. 4, p. 517-531, 1992.