

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Estudos de afinidade ao cálcio
(Ca²⁺) de cultivares de
Lycopersicon esculentum Mill.**

Tese de Doutoramento

Maria Amely Zavattieri Potes

ÉVORA, 1998

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Estudos de afinidade ao cálcio
(Ca²⁺) de cultivares de
Lycopersicon esculentum Mill.**

Tese de Doutoramento



92146

Maria Amely Zavattieri Potes

ÉVORA, 1998

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Estudos de afinidade ao cálcio
(Ca²⁺) de cultivares de
Lycopersicon esculentum Mill.**

Maria Amely Zavattieri Potes

Tese apresentada à Universidade de Évora para obtenção
do grau de Doutor no ramo de Biotecnologia Vegetal.

ÉVORA, 1998

ÍNDICE

ÍNDICE	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ABREVIATURAS	xiv
AGRADECIMENTOS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xx
1 – INTRODUÇÃO	22
1.1 - Justificação e objectivos do trabalho	22
1.1.1 - Os problemas das deficiências de Ca ²⁺ (A podridão apical em tomate)	22
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 - Caracterização do ião cálcio	25
2.2 - Absorção transporte e traslocação do Ca ²⁺ na planta	27
2.2.1 - Absorção ao nível radicular	27
2.2.1.1 - Interacção com outros iões	30
2.2.1.1.1 – Competição	30
2.2.1.1.2 – Sinergismo	30
2.2.2 - Transporte através da raiz até os vasos xilémicos radicais	31
2.2.3 - Movimento até a parte aérea ou até aos órgãos de armazenamento	33
2.2.4 - Regulação hormonal do transporte de Ca ²⁺	36
2.2.5 - Transporte de Ca ²⁺ pelo floema	38
2.3 - Compartimentação intra e extra celular do Ca ²⁺	41
2.3.1 – Vacúolos	42
2.3.2 - Retículo endoplasmático	42
2.3.3 - Plastídios e mitocôndrias	43
2.3.4 – Núcleo	44
2.3.5 – Citosol	44
2.3.6 - Membrana plasmática	45
2.3.7 - Parede celular	46
2.4 - Processos intra e extra celulares mediados pelo Ca ²⁺	46
2.4.1 - Estabilização da membrana plasmática pelo Ca ²⁺	46
2.4.2 - Estabilização da estrutura da parede celular pelo Ca ²⁺ e crescimento celular	47
2.4.3 - Efeitos do Ca ²⁺ no metabolismo dos carboidratos	49
2.5 - Homeostasia cálcica (Mecanismos da regulação do Ca ²⁺)	52

2.5.1 - Transportadores de efluxo	53
2.5.1.1 - Bombas de Ca^{2+} (ATPases)	53
2.5.1.2 - Contraportadores (<i>antiporters</i>)	55
2.5.2 - Transportadores de influxo	56
2.5.2.1 - Canais que funcionam com voltagem	57
2.5.2.2 - Canais operados por mensageiros secundários	58
2.5.2.3 - Canais operados por mecanismos de tensão (<i>Stretch-operated channels</i>)	59
2.6 - O Ca^{2+} como mensageiro secundário (Agente de sinalização)	60
2.6.1 - Proteínas ligadas ao Ca^{2+} : a calmodulina	63
2.6.2 - Proteínas dependentes do Ca^{2+} mas independentes da calmodulina	64
2.6.3 - Câmbios no Ca^{2+} citosólico em resposta a sinais de <i>stress</i>	64
3 - MATERIAL E MÉTODOS	68
3.1 - Material vegetal	68
3.2 - Selecção do material vegetal	68
3.3 - Desinfecção superficial das sementes e esterilização dos utensílios	69
3.4 - Meios de cultura	70
3.4.1 - Preparação das soluções mãe e dos meios de cultura	71
3.5 - Condições físicas da cultura	72
3.6 - Obtenção dos parâmetros biométricos	72
3.6.1 - Comprimento	73
3.6.2 - Matéria seca	73
3.7 - Determinações do conteúdo de Ca^{2+} nos tecidos	74
3.8 - Desenho experimental e análise dos dados	75
4 - EXPERIÊNCIA 1	76
4.1 - Introdução e objectivo	76
4.2 - Material e métodos	76
4.2.1 - Meios de cultura (tratamentos)	76
4.2.2 - Tamanho das células (comprimento)	78
4.2.3 - Densidade celular dos tecidos da parte aérea	78
4.3 - Resultados	79
4.3.1 - Conteúdo de Ca^{2+} nos tecidos	79
4.3.1.1 - Parte aérea	79
4.3.1.2 - Conteúdo de Ca^{2+} na raiz	81
4.3.1.3 - Distribuição do cálcio absorvido entre os tecidos da parte aérea e da raiz	82
4.3.2 - Parâmetros biométricos	84

4.3.2.1 - Comprimento da parte aérea (hipocótilo)	84
4.3.2.2 - Comprimento da raiz	86
4.3.2.3 - Matéria seca da parte aérea	87
4.3.2.4 - Matéria seca da raiz	88
4.3.2.5 - Razão matéria seca da raiz/matéria seca da parte aérea	89
4.3.2.6 - Razão matéria seca/comprimento (“densidade celular”)	89
4.3.2.7 - Tamanho das células (comprimento)	91
4.3.3 - Eficiência de utilização do íon cálcio para a produção de matéria seca	92
4.4 - Discussão dos resultados	94
5 - EXPERIÊNCIA 2	100
5.1 - Introdução e objectivos	100
5.2 - Material e métodos	101
5.2.1 - Meios de cultura	101
5.3 - Resultados	103
5.3.1 - Conteúdo de Ca^{2+} nos tecidos	103
5.3.1.1 - Parte aérea	103
5.3.1.2 - Raiz	106
5.3.2 - Parâmetros biométricos	108
5.3.2.1 - Comprimento da parte aérea (hipocótilo)	108
5.3.2.2 - Comprimento da raiz	109
5.3.2.3 - Razão: comprimento da raiz/comprimento do hipocótilo	110
5.3.2.4 - Matéria seca da parte aérea	111
5.3.2.5 - Matéria seca da raiz	113
5.3.3 - Eficiência de utilização do íon cálcio em função da fonte de azoto utilizada	113
5.4 - Discussão dos resultados	116
6 - EXPERIÊNCIA 3	120
6.1 - Introdução e objectivos	120
6.2 - Material e métodos	120
6.3 - Resultados	121
6.3.1 - Resultados da parte aérea	121
6.3.1.1 - Conteúdo de Ca^{2+} na parte aérea	121
6.3.1.2 - Parâmetros biométricos	122
6.3.2 - Resultados da raiz	124
6.3.2.1 - Conteúdo de Ca^{2+}	124
6.3.2.2 - Parâmetros biométricos	126

6.4 - Discussão dos resultados	127
6.4.1 - Parte aérea	127
6.4.2 - Raiz	131
7 - EXPERIÊNCIA 4	136
7.1 – Introdução e objectivos	136
7.2 - Material e métodos	137
7.3 – Resultados	138
7.3.1 - Conteúdo de Ca ²⁺ nos tecidos	138
7.3.1.1 - Parte aérea	138
7.3.1.2 – Raiz	140
7.3.2 - Parâmetros biométricos	141
7.3.2.1 - Comprimento da parte aérea (hipocótilo)	141
7.3.2.2 - Comprimento da raiz	143
7.3.2.3 - Matéria seca da parte aérea	145
7.3.2.4 - Matéria seca da raiz	146
7.4 - Discussão dos resultados	147
8 – CONCLUSÕES	150
BIBLIOGRAFIA	153
ANEXOS	
I – Meio de Murashige e Skoog (1962)	161
II – Vitaminas de Morel (1950)	162
III – Tabela de registo de dados nº 1. (Comprimento)	163
IV – Tabela de registo de dados nº 2. (Matéria seca)	164
V – Tabela de registo de dados nº 3. (Ca ²⁺)	165
VI – Análise de variância da experiência 1	166
VII – Análise de variância da experiência 2	168
VIII – Análise de variância da experiência 3	171
IX – Análise de variância da experiência 4	173

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1-**Modelo proposto por Clarkson (1984) no desvio da direcção dos fluxos de Ca^{2+} do apoplasto para o interior do simplasto das células endodérmicas e subsequente efluxo activo para o interior do apoplasto estelar. A ciclose citoplasmática participaria na transferência do cálcio ligado através do citosol. Fonte: Clarkson, (1984).....32
- Figura 2.2-**Representação esquemática de duas células adjacentes com a distribuição típica de Ca^{2+} . Marschner, 1995.....41
- Figura 2.3-**Identidade e localização dos sistemas de transporte envolvidos na homeostasia do Ca^{2+} no citosol. Fonte: Johannes et al., 1991 citados por Bethke et al., 1995.....58
- Figura 2.4-**Elementos da homeostase e transporte que ligam os sinais hormonais às respostas celulares numa célula vegetal, Bethke et al., (1995).....61
- Figura 2.5-**Modelo do papel do cálcio como mensageiro secundário na transdução de sinais em células vegetais. R: sítios de recepção de sinais externos; por ex.: ABA; IAA. Fonte: Marschner, 1995.....63
- Figura 2.6-**Ilustração dos eventos propostos que envolvem cálcio, calmodulina e calmodulina ligada a proteínas nos processos de tolerância/ resistência ao *stress*. Este modelo baseia-se nos seguintes estudos: Poovaiah e Readdy, 1993; Knight et al., 1991; Lynch et al., 1989; Knight et al., 1993; Braam e Davis, 1990; citados por Reddy, 1995.....67
- Figura 3.1-**Tamanho de uma plântula de tomate com 15 dias de cultura. A parte aérea é composta pelo hipocótilo, cotilédones e os primórdios foliares pouco desenvolvidos.....72
- Figura 3.2-**Medição manual do comprimento do hipocótilo.....73
- Figura 3.3-**Caixas de Petri com o material vegetal na estufa de secagem.....73
- Figura 4.1-**Intervalos de confiança (95% dms) para o conteúdo médio de Ca^{2+} (mg g^{-1} MS), das duas variedades, em função da concentração de cálcio adicionado ao meio (mM).....80
- Figura 4.2-**Intervalos de confiança (95% dms) para o conteúdo de Ca^{2+} (mg g^{-1} MS) nos tecidos da parte aérea em função das variedades; para o total das concentrações de cálcio testadas.....80
- Figura 4.3-**Conteúdo de cálcio (mg g^{-1} MS) para plântulas de 15 dias de ambas as variedades em função da quantidade de cálcio adicionado ao meio (mM).a; b, diferenças significativas entre as médias das variedades ($p < 0.05$).....81

- Figura 4.4**-Intervalos de confiança (95% dms) para o conteúdo de cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS) em função do cálcio no meio (mM). Valores para a média das duas variedades.....81
- Figura 4.5**-Intervalos de confiança (95% dms) para o conteúdo de cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS) em função das variedades. Média dos valores de todas as concentrações de cálcio para cada variedade.....81
- Figura 4.6**-Conteúdo de cálcio na raiz (mg g^{-1} MS) em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio de cultura (mM). **a; b** diferenças significativas entre variedades.....82
- Figura 4.7**-Partição do cálcio (em percentagem) entre a parte aérea e a raiz (plântulas de 15 dias) de Hypeel (4.7a) e Zenith (4.7b) para cada nível de cálcio no meio. O comprimento das barras mostra as percentagens do cálcio total para cada órgão e os valores numéricos sobre as barras a quantidade de Ca^{2+} por grama de matéria seca de cada órgão.....83
- Figura 4.8**-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento dos hipocótilos (cm) em função da quantidade de cálcio adicionado ao meio de cultura (mM). Os valores representam as médias para os valores de ambas as variedades.....84
- Figura 4.9**-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento dos hipocótilos em função das variedades. Valores médios para o total das concentrações testadas.....84
- Figura 4.10**-Comprimento do hipocótilo (cm) em função da concentração de cálcio no meio (mM). **a; b** diferenças significativas entre variedades.....85
- Figura 4.10a**-Diferenças no comprimento dos hipocótilos de plântulas de 15 dias de Hypeel, submetidas a diferentes concentrações de cálcio no meio. Meios sem adição de cálcio (Sem Ca^{2+}) e meios com 3.00 mM de cálcio (MS).....85
- Figura 4.11**-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento da raiz em função da concentração de cálcio no meio (mM). Valores correspondentes à média das duas variedades.....86
- Figura 4.12**-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento das raízes (cm) em função da variedade para o total dos tratamentos.....86
- Figura 4.13a**-Relação inversa entre a quantidade de cálcio adicionada ao meio de cultura e a matéria seca da parte aérea das plântulas de 15 dias de Hypeel.....87
- Figura 4.13b**-Relação inversa entre a quantidade de cálcio adicionada ao meio de cultura e a matéria seca da parte aérea das plântulas de 15 dias de Zenith.....87
- Figura 4.14**-Intervalos de confiança (95% dms) para a quantidade de matéria seca da raiz em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio (mM). Valores médios para ambas as variedades.....88

- Figura 4.15**-Intervalos de confiança (95% dms) para a quantidade de matéria seca da raiz (mg) em função das variedades. Valores médios para o total dos tratamentos.....88
- Figura 4.16**-Valores de densidade celular em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio.....90
- Figura 4.17**-Intervalos de confiança (95%dms) para o comprimento das células (mm) em função da concentração de cálcio (mM). Média das duas variedades.....91
- Figura 4.18**-Intervalos de confiança (95%dms) para o comprimento das células (mm) em função da variedade. Média de todas as concentrações de cálcio testadas.....91
- Figura 4.19**-Variação do comprimento médio das células das duas variedades em função da concentração de cálcio (mM).....91
- Figura 4.20**-Eficiência de utilização do ião cálcio($1/F_n$) em função da quantidade de cálcio adicionado ao meio.....93
- Figura 5.1**-Conteúdo de cálcio na parte aérea (mg g^{-1} MS) para plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith, em função da concentração de cálcio no meio (mM). As curvas (---) representam os valores de cálcio interno para os meios A ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ \cong 2:1$). As curvas (—) representam os valores de cálcio interno para os meios B (NO_3^- como única fonte de azoto). a, b: diferenças significativas entre variedades para cada nível de cálcio no meio e fonte de azoto utilizada.....104
- Figura 5.2**-Resultados da análise de variância para o conteúdo de cálcio nos tecidos da parte aérea em função da interação entre as fontes de azoto e as variedades. A- numa relação de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ \cong 2:1$ e B- NO_3^- como única fonte de azoto.....105
- Figura 5.3**-Variação na quantidade de cálcio na parte aérea (mg g^{-1} MS) das plântulas da variedade Hypeel em função das quatro fontes de azoto testadas.....106
- Figura 5.4**-Variação na quantidade de cálcio na parte aérea (mg g^{-1} MS) das plântulas da variedade Zenith em função das quatro fontes de azoto testadas.....106
- Figura 5.5**-Intervalos de confiança (95% dms) para o factor cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS) em função do conteúdo de cálcio no meio (mM), para os meios com 39.4 mM de NO_3^- + 20.6 mM de NH_4^+ . Valores médios de ambas as variedades.....107
- Figura 5.6**-Intervalos de confiança (95% dms) para o factor cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS) em função do conteúdo de cálcio no meio (mM) para os meios com 39.4 mM de NO_3^- . Valores médios de ambas as variedades.....107
- Figura 5.7**-Intervalos de confiança (95% dms) para a média do conteúdo de cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS) em função das variedades quando a fonte de azoto foi 39.4 mM de NO_3^- + 20.6 mM de NH_4^+108
- Figura 5.8**-Intervalos de confiança (95% dms) para a média do conteúdo de cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS) em função das variedades quando a fonte de azoto foi 39.4 mM de NO_3^-108

- Figura 5.9**-Conteúdo médio de cálcio das raízes (mg g^{-1} MS) de Hypeel e Zenith em função das diferentes quantidades de cálcio adicionado (mM), para os meios que só continham NO_3^- como única fonte de azoto. **a, b**: diferenças significativas entre as variedades.....108
- Figura 5.10**-Efeito da fonte de azoto e da concentração de cálcio no meio (mM) sobre o comprimento (cm) dos hipocótilos das plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith, para os meios com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ 109
- Figura 5.11**-Efeito da fonte de azoto e da concentração de cálcio no meio (mM) sobre o comprimento (cm) dos hipocótilos das plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith, para os meios com NO_3^- 109
- Figura 5.12**-Efeito da fonte de azoto e da concentração de cálcio no meio sobre o comprimento (cm) da raiz das plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith, para os meios com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ 110
- Figura 5.13**-Efeito da fonte de azoto e da concentração de cálcio no meio sobre o comprimento (cm) da raiz das plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith, para os meios com NO_3^- 110
- Figura 5.14**-Razão dos comprimentos raiz/hipocótilo para Hypeel e Zenith em relação as duas fontes de azoto e dos mM de cálcio adicionados ao meio. (---) meios com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ (meios A); (—) meios só com NO_3^- como única fonte de azoto (meios B).....111
- Figura 5.15a**-Variações na matéria seca da parte aérea (mg) para os meios que continham 39.4 mM de $\text{NO}_3^- + 20.6$ mM de NH_4^+ (meios A) em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio (mM).....112
- Figura 5.15b**-Variações na matéria seca da parte aérea (mg) para os meios que continham 39.4 mM de NO_3^- (meios B) em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio (mM).....112
- Figura 5.16**-Variações na matéria seca da raiz em função das fontes de azoto e do conteúdo de cálcio (mM) no meio, para plântulas de 15 dias das variedades Hypeel e Zenith. As curvas (----) representam os meios com 39.4 mM de $\text{NO}_3^- + 20.6$ mM de NH_4^+ (meios A). As curvas (—) representam os que só continham 39.4 mM de NO_3^- (meios B).....113
- Figura 5.17**-Curvas de regressão e respectivos coeficientes para Hypeel e Zenith em função das fontes de azoto. Meios A com $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ e meios B só com NO_3^- 115
- Figura 6.1**-Conteúdo de cálcio na parte aérea (mg g^{-1} MS), para plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith, em função da quantidade de cálcio adicionada no meio (0.45 e 4.5 mM) e de sacarose (sem adição, 29.2 e 58.4 mM). **a, b** diferenças significativas entre as variedades.....122

- Figura 6.2**-Matéria seca e comprimento das plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith em função do conteúdo de cálcio (0.45 e 4.5 mM) e de sacarose no meio (sem adição, 29.2 e 58.4 mM).....123
- Figura 6.3**-Conteúdo de cálcio na raiz (mg g^{-1} MS) para plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith em função das quantidades de cálcio (0.45 e 4.5 mM) e de sacarose (sem adição, 29.2 e 58.4 mM) adicionadas ao meio de cultura. a; b diferenças significativas entre as variedades.....125
- Figura 6.4**-Matéria seca e comprimento das plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith em função do conteúdo de cálcio (0.45 e 4.5 mM) e de sacarose no meio (sem adição, 29.2 e 58.4 mM).....127
- Figura 7.1a**-Intervalos de confiança (95% dms) para a quantidade de cálcio nos tecidos da parte aérea (mg g^{-1} MS), em função do nível de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para os meios aos que foram adicionados 0.45 mM de cálcio. Médias das duas variedades.....139
- Figura 7.1b**-Intervalos de confiança (95% dms) para a quantidade de cálcio nos tecidos da parte aérea (mg g^{-1} MS), em função do nível de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para os meios aos que foram adicionados 4.5 mM de cálcio. Médias das duas variedades.....139
- Figura 7.2a**-Intervalos de confiança (95% dms) para a quantidade de cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS), em função do PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para os meios aos que foram adicionados 0.45 mM de cálcio. Médias das duas variedades.....140
- Figura 7.2b**-Intervalos de confiança (95% dms) para a quantidade de cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS), em função do PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para os meios aos que foram adicionados 4.5 mM de cálcio. Médias das duas variedades.....140
- Figura 7.3a**-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento (cm) da parte aérea das duas variedades, em função do nível de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para os meios aos que foram adicionados 0.45 mM de cálcio. Médias das duas variedades.....142
- Figura 7.3b**-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento da parte aérea (cm) das duas variedades, em função do nível de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para os meios aos que foram adicionados 4.5 mM de cálcio. Médias das duas variedades.....142
- Figura 7.4a**-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento da raiz para as médias dos dados das duas variedades em função do nível da PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); para 0.45 mM de cálcio adicionados ao meio.....144
- Figura 7.4b**-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento da raiz para as médias dos dados das duas variedades em função do nível da PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); para 4.50 mM de cálcio adicionados ao meio.....144
- Figura 7.5a**-Intervalos de confiança (95% dms), para a matéria seca da parte aérea (mg) em função do nível de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para os meios aos que foram adicionados 0.45 mM de cálcio. Médias das duas variedades.....146

Figura 7.5b-Intervalos de confiança (95% dms), para a matéria seca da parte aérea (mg) em função do nível de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para os meios aos que foram adicionados 4.50 mM de cálcio. Médias das duas variedades.....	146
---	------------

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 2.1** - Efeito da concentração de cálcio na solução nutritiva sobre a taxa de crescimento relativa de duas espécies e conteúdos de cálcio nos tecidos da parte aérea.....26
- Tabela 2.2** - Variações na concentração dos íons cálcio e potássio na solução externa e na seiva das raízes de milho e feijão.....28
- Tabela 2.3** - Tamanho dos poros nas paredes celulares da rizoderme e do córtex e tamanho dos íons cálcio e potássio hidratados.....28
- Tabela 2.4** - Efeito do Ca^{2+} na selectividade das raízes sobre K^+/Na^+31
- Tabela 2.5** - Comparação dos níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em exsudados de floema e xilema de *Nicotiana glauca*.....40
- Tabela 2.6** - Importes de K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} pelo ápice terminal e folhas jovens de ricino, *Ricinus communis*.....41
- Tabela 2.7** - Estimações da concentração de Ca^{2+} livre no citosol de tecidos vegetais.....45
- Tabela 2.8** - Propriedades dos transportadores de Ca^{2+} nas membranas de células vegetais.....55
- Tabela 2.9** - Bombas de Ca^{2+} estimuladas pela calmodulina (CaM) identificadas em membranas vegetais intracelulares.....55
- Tabela 2.10** - Estímulos que produzem câmbios na concentração citosólica de Ca^{2+} nas células vegetais.....65
- Tabela 2.11** - Sinais ambientais, hormonais e de *stress* que produzem câmbios nos níveis de Ca^{2+} no citosol das células dos vegetais superiores.....66
- Tabela 2.12** - Outros mensageiros secundários nas plantas.....67
- Tabela 3.1** - Percentagem de frutos com podridão apical rejeitados por variedade em cada uma das colheitas manuais.....69
- Tabela 3.2** - Percentagem de frutos com podridão apical rejeitados por variedade na colheita mecânica.....69
- Tabela 4.1** – Quantidades de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em mg l^{-1} adicionados ao meio de Murashige e Skoog (1962), e correspondentes valores em mM e meq de cálcio para cada tratamento.....77
- Tabela 4.2** – Conteúdos médios de cálcio nos componentes de um tubo de ensaio (10 ml de meio) e a respectiva semente, no momento do início da cultura. Apresenta-se

também um cálculo em função de um litro para efeitos de comparação com a Tabela 4.1.....	78
Tabela 4.3 – Razão matéria seca da raiz/matéria seca da parte aérea (para as duas variedades estudadas) em função de duas concentrações de cálcio no meio.....	89
Tabela 4.4 - Eficiência de utilização do Ca^{2+} em função da concentração de cálcio no meio (parte aérea).....	92
Tabela 4.5 - Percentagem de cálcio na matéria seca da parte aérea para três concentrações de cálcio no meio.....	94
Tabela 5.1 - Composição da solução de macronutrientes em mg l^{-1} , meios A e B.....	102
Tabela 5.2 - Composição da solução de macronutrientes em mM, meios A e B.).....	102
Tabela 5.3 - Composição da solução de macronutrientes em mg l^{-1} , meios C e D.....	103
Tabela 5.4 - Composição da solução de macronutrientes em mM, meios C e D.....	103
Tabela 5.5 – Percentagem de cálcio na matéria seca das variedades estudadas em função da quantidade de cálcio no meio de cultura para as duas fontes de azoto utilizada.....	114
Tabela 6.1 - Conteúdos de cálcio (mM) e de sacarose (em gramas e mM) por tratamento na experiência 3.....	120
Tabela 6.2 - Peso fresco e peso seco de plantas de 5 semanas de beterraba sacarina cultivadas em meio contendo varias concentrações de cálcio.....	129
Tabela 6.3 - Influência do conteúdo de sacarose no meio de enraizamento <i>in vitro</i> , no comprimento das raízes e da parte aérea no cultivar “Riesling”.....	134
Tabela 7.1 - Conteúdos de cálcio (mM) e de PAR por prateleira (tratamento).....	138
Tabela 7.2 - Cálcio nos tecidos da parte aérea das plântulas das duas variedades estudadas, em função dos níveis de PAR e variação percentual de Ca^{2+} entre o nível máximo e mínimo de radiação.....	139
Tabela 7.3 - Cálcio nos tecidos da raiz das plântulas das duas variedades, em função dos níveis de PAR e variação percentual de Ca^{2+} entre o nível máximo e mínimo de radiação.....	141
Tabela 7.4 - Comprimento da parte aérea das plântulas das duas variedades, em função dos níveis de PAR e de cálcio no meio e variação percentual do comprimento entre o nível máximo e mínimo de radiação.....	143
Tabela 7.5 - Comprimento da raiz principal em função dos níveis de PAR e de cálcio no meio e variação percentual do comprimento entre o nível máximo e mínimo de radiação.....	145

ABREVIATURAS

- $\Delta\psi$: Gradientes de potencial eléctrico
 $\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$: Diferenças de potenciais electroquímicos para o ião cálcio
 $[\text{Ca}^{2+}]_i$: Concentração intracelular de cálcio livre
 $\mu\text{eq. g}^{-1}$: Microequivalente por grama
 $\mu\text{g ml}^{-1}$: Microgramas por mililitro
 μM : Micromolar
 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$: Micromoles por metro quadrado por segundo
 Ψ_{mp} : Potenciais eléctricos da membrana plasmática
 ΔpH : Gradientes de pH
 ^{14}C : Isótopo 14 do carbono
 $^{45}\text{Ca}^{2+}$: Isótopo 45 do cálcio
ABA: Ácido abscísico
ANOVA: Análise de variância
ATP: Adenosina 5' trifosfato
ATPases: Adenosina 5'trifosfato-hidrolase EC-3.6.1.3
 Ca^{2+} : Ião cálcio
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Biclureto de cálcio dihidratado
 CaCl_2 : Cloreto de cálcio
CaM: Calmodulina
 Cd^{2+} : Ião cádmio
Dens.: Densidade
DHP: Hidroxipiridina
dms: Diferença mínima significativa
FeEDTA: Etileno-diamino-tetra-acetato com ferro quelatizado
 f_n : Conteúdo fraccional de um nutriente (gramas do nutriente por grama)
 GA_3 : Ácido giberélico
GTP: Guanosina trifosfato
 H^+ : Protão
IAA: Ácido indol 3-acético
 IP_3 : Inositol 5' trifosfato
ITP: Δ^3 -isopentenil pirofosfato
 Jmol^{-1} : Joule por mol
 K^+ : Ião potássio
KDa: Kilo dalton
 KJ mol^{-1} : Kilo joule por mol
 K_m : Constante de Michaelis

La³⁺: Ião lantânio
LAR: Ligações de alta resistência da parede celular
M: Molar
meq.: Miliequivalente
mg g⁻¹ MS: miligrama por grama de matéria seca
mg l⁻¹: Miligrama por litro
mg: Miligrama
Mg²⁺: Ião magnésio
mM: Milimolar
mmol g⁻¹: Milimoles por grama
MP: Membrana plasmática
MQ: Média dos quadrados
MS: Meio de cultura de Murashige e Skoog, (1962).
mV: Milivolt
N: Normal
Na⁺: Ião sódio
NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido; forma oxidada
NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; forma oxidada
NaOH: Hidróxido de sódio
NH₄⁺: Ião amônio
nm: Nanometro
nM: Nanomolar
nmol: Nanomol
NO₃⁻: Ião nitrato
NO₃K: Nitrato de potássio
NO₃NH₄: Nitrato de amônio
p/v: Peso em volume
PAR: Radiação Fotosinteticamente Activa (Photosynthetic Active Radiation)
pmf: Força motriz protónica
ppm: Partes por milhão
pS: Pico siemens
RE: Retículo endoplasmático
RS: Retículo sarcoplásmico
SQ: Soma dos quadrados
TMB-8: Ácido 3,4,5-Trimetoxibenzoico 8-(Dietilamino)octil Ester.
TP: Tonoplasto
V: Volume

AGRADECIMENTOS

Cuando quiero expresar lo que me va en el alma solo consigo hacerlo en mi lengua de origen, por este motivo los agradecimientos los he escrito en español .

Agradezco muy especialmente a mis hijos y a mi marido porque han soportado sin reproches mis largas ausencias durante la realización de la tesis; vuestro silencio ha sido el mejor reconocimiento a mi trabajo. También la he hecho por ustedes...

A la Dra.Yvonne Pourrat mi profundo agradecimiento, no solo por la orientación constante a lo largo del desarrollo de la tesis, sino especialmente por el incansable apoyo, colaboración, buena disposición y sobre todo por tu amistad incondicional.

Quiero agradecer a mi mamá y a mis hermanos, porque siempre han confiado en mí y en mi trabajo y nunca me han dejado de dar ánimo.

Mi sincero agradecimiento al Professor Luis Gazarini, que fué mi orientador en la Universidade de Évora, y que por otro lado tuvo la pesada tarea de traducir del “portuñol” para el portugues. Aun así, supongo que ésta continuará a tener un “sutaque” extranjero.

A la Dra. Alejandra Costa que me dió la oportunidad de discutir los aspectos científicos de este trabajo. También porque buscó, leyó se informó y consiguió siempre darme las respuestas que procuraba. Cada *paper* sobre el cálcio que le pasaba por las manos ela fotocopió para mí, fué realmente un gran apoyo, gracias Ale.

Mi colega en el Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal , Eng. Augusto Peixe, mecere sin duda mi agradecimiento. Fué quien presenció de cerca todo el proceso de preparación de esta tesis. Tuvo que tener mucha paciencia conmigo, especialmente en aquellos días en que las cosas no son como queremos, en que todo nos corre mal y solo nos apetece desaparecer del mapa. También me ayudó en las correcciones del portugués.

A la Dra. Carola Meierrose que a estas altas horas de la noche, y ya en el principio del fin de la tesis, está aquí (como lo estuvo en otras oportunidades) para darme ánimo y en esta noche también algunos cafés.

Al Profesor Colaço do Rosário que nos acogió en su Laboratório de Enologia cuando la cultura *in vitro* era en esta Universidad apenas una idea de trabajo. Fué allí que esta tesis comenzó su gestación, en un ambiente de gran cordialidad, y calidad humana, gracias a la presencia de Antónia, de doña Maria Emilia de de todos los que allí trabajaban.

Agradezco igualmente al Profesor Goç Alves Ferreira que disponibilizó los recursos del Laboratório de Química de Solos da Universidade de Évora indispensables para realizar las análisis de cálcio en la matéria seca. A la Licenciada Maria de Lourdes Pimenta, y demás personal técnico de dicho laboratório, gracias por vuestra colaboración.

Al Profesor Cruz de Carvalho que leyó y corrigió una buena parte de la tesis

A Jorge Velez, técnico de esta Universidad que me ayudó en la ardua tarea de medir y pesar tantas y tantas pequeñas plantas.

Entre otros quiero expresar mi agradecimiento a Sahana Tarek, a Anabela Mendes, a “Caramela” e a Isabel Freitas porque consiguieron transformar la rutina del trabajo en buenos momentos compartidos.

No quería olvidarme de nadie, pero seguramente debido al cansancio y la hora en que estoy escribiendo, me dejaré a alguien en el tintero, mil disculpas.

A mis amigos no les agradezco, les pido antes perdón por si no he estado presente cuando hacia falta por estar demasiado ocupada con la tesis.

Cris, si no te tuviera a tí.....

No..., no me olvido de tí, tu siempre me apoyaste y me diste el coraje de llegar hasta aquí, esta es la mejor herencia que alguna vez me podías dejar, por eso esta tesis te la dedico a ti, papá.

RESUMO

Apesar do considerável interesse que revestem os estudos sobre nutrição cálcica e a importância da mesma na fisiologia e morfogênese vegetal, só um limitado número de estudos tem sido realizados para avaliar as diferenças varietais em relação à absorção, transporte, translocação e eficiência de utilização do cálcio, como um conceito integrado.

Os estudos sobre o cálcio estão comumente relacionados com as suas funções bioquímicas, desenvolvimento vegetal, transporte pelas membranas celulares e entre os diferentes tecidos da planta, com os seus efeitos sobre a síntese da parede celular, e mais recentemente a sua função como substância de sinalização.

No entanto, no presente estudo abordou-se sob o ponto de vista integrado os efeitos do cálcio sobre todas as partes da planta, salientando as diferenças varietais em relação à afinidade das mesmas pelo cálcio em estádios prematuros da vida da planta (teste precoce).

Utilizou-se a cultura *in vitro* como método de trabalho por permitir um controle apurado tanto da composição dos meios como das condições ambientais a que foram sujeitas as plântulas durante o decorrer dos ensaios.

Incorporou-se o conceito de teste precoce, ou seja as plântulas foram retiradas do meio passados 15 dias do início da cultura; procedendo-se a avaliação das variedades em função da sua afinidade pelo cálcio.

Analisaram-se os efeitos que diversas concentrações de cálcio teriam sobre o conteúdo de cálcio nos tecidos da parte aérea e da raiz das variedades seleccionadas, e quais as modificações que os níveis de cálcio nos tecidos teriam sobre os parâmetros biométricos.

Estudos preliminares no campo permitiram seleccionar duas variedades com diferente susceptibilidade à podridão apical (*Blossom-end-rot*), sendo esta uma desordem fisiológica que se caracteriza por uma marcada deficiência de cálcio na

parte distal dos frutos e que no tomate para indústria representa uma das principais causas de depreciação dos frutos para a indústria de pelado e concentrado.

O meio de cultura de base para todas as experiências realizadas neste trabalho foi o de Murashige e Skoog (1962) modificado em relação à concentração de cálcio (as quais variaram, segundo as experiências entre não adição e 4.5 mM).

Testou-se também o comportamento das variedades em função dos níveis de cálcio externo quando submetidas a diferentes quantidades de energia, tanto da energia fotossintética (plantas em regime autotrófico) como aquela que é incorporada através da sacarose do meio (regime heterotrófico).

Por outro lado modificou-se a quantidade e qualidade da fonte de azoto incorporada no meio de cultura e observou-se o seu efeito na absorção e translocação do cálcio na planta.

Para caracterização das variedades em função da sua afinidade com o cálcio foram medidos vários parâmetros biométricos, assim como os conteúdos internos de cálcio, a partição do cálcio entre raiz e parte aérea e a eficiência de utilização do ião pelas variedades.

Encontraram-se diferenças substanciais entre as variedades no que diz respeito a homeostasia cálcica e à eficiência de utilização do ião, especialmente quando submetidas a condições extremas de cálcio no meio (défice e excesso).

As cultivares analisadas apresentaram variações nos seus parâmetros biométricos, estando estes correlacionados com os conteúdos de cálcio nos tecidos o que mostra variações estruturais e fisiológicas entre elas. As alterações energéticas (sacarose e PAR), e das fontes de azoto incorporadas no meio, modificaram substancialmente as quantidades de cálcio nos tecidos das duas variedades.

ABSTRACT

Despite the considerable interest in calcium nutrition and its importance in the physiology and morphogenesis of plants, only a limited number of studies have especially focused on variety differences in calcium uptake, distribution and use efficiency in an integrated concept.

Calcium studies are commonly related with biochemical functions, plant development, and transport by membranes and between tissues, effects on the wall syntheses, on carbohydrate metabolism, calcium as a signal substance and recently calcium pumping ATPase.

Our approach however involves the integration of all the seedling parts tries to point out differences between varieties relatively to their Ca^{2+} affinity at early stage of plant life. We analysed also the effect of calcium in a wide range of calcium media concentration. We used artificial conditions (*in vitro* culture) to control the nutrient medium composition and the environmental conditions of the plant.

Preliminary experiments in the field on tomato blossom end rot (physiological disorder related to calcium fruits deficiency) allowed us to select two varieties with different calcium sensibility.

We used Murashige and Skoog (1962) basal medium modified for calcium concentration (in a range between traces and 4,5 mM of calcium) to evaluate the varieties behaviour on calcium media content. Otherwise we tested the varieties at different levels of calcium media content in relation with the quantity of energy brought by the photosynthetic active radiation (PAR) and by different quantities of sucrose. We also tested the interaction between the quantity and quality of nitrogen in the media and the calcium absorption and distribution in the plant.

Biometrics parameters, tissue calcium content, partitioning of calcium between the seedling parts, and calculations of the calcium use efficiency are used to evaluate variety differences.

Substantially differences about calcium homeostasis and calcium used efficiency are found between varieties, especially at the extremes (deficit and excess of calcium media concentration).

The biometrics parameters in correlation with the calcium media content reflect also structural and physiological variation. The level of energy as a carbon source modifies substantially the capacity of the internal calcium regulation and this capacity was not the same for the two varieties. One of the varieties showed much more efficiency to regulate tissue calcium content even when no sucrose is added and PAR is reduced to 50%. These results could be analysed in terms of calcium pump system efficiency.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Justificação e objectivos do trabalho

1.1.1 - Os problemas das deficiências em cálcio

(A podridão apical em tomate)

Em Portugal a cultura do tomate é a principal cultura para a indústria alimentar, transformando cerca de 600 000 toneladas de frutos frescos por ano, dos quais 98% destinam-se à fabricação de concentrado; 90% deste destina-se à exportação. As zonas de produção estão concentradas nas regiões do Ribatejo, Estremadura e Alentejo (Braga da Cruz, 1990).

A podridão apical do tomateiro é o factor de prejuízo mais frequente e importante na cultura do tomate para indústria em Portugal (Meierrose, 1990). Esta alteração fisiológica é causada por uma deficiência de cálcio localizada na porção distal dos frutos. Os frutos afectados apresentam na zona apical, uma necrose superficial com a forma de uma mancha ligeiramente deprimida e arredondada, de cor castanha (Cardoso Ribeiro, 1992).

Para além da podridão apical existem outras enfermidades fisiológicas relacionadas com a falta de cálcio como são: o abotoamento na couve-flor, o *tip burn* na alface, o *blackheart* no aipo, o *bitter pit* na maçã, a podridão apical no pimento doce e no melão, etc. (Shear, 1975; Bangerth, 1979 citados por Marschner, 1995). Todas estas deficiências estão associadas com as altas taxas de crescimento e baixas taxas de transpiração o que em conjunto, incrementam o risco de que o conteúdo de cálcio seja menor que o nível crítico de cálcio requerido para a estabilidade da parede celular e integridade das membranas dos órgãos afectados.

Diversos factores seriam responsáveis pelo aumento da incidência da podridão apical no tomate, entre eles pode-se citar;

- o *stress* hídrico (Adam e El-Gizawy, 1986, citado por Brown e Ho, 1993);
- o *stress* osmótico na zona das raízes (Ehret e Ho, 1986 citados por Brown e Ho, 1993);

- a susceptibilidade do cultivar (Adams e Ho, 1992);
- o ensombramento (Ho et al., 1993);
- os factores que influenciam a longo prazo o desenvolvimento do fruto e particularmente o desenvolvimento do tecido xilémico (Ho et al., 1993, citados por Brown e Ho, 1993) e
- o antagonismo com outros catiões como ocorre com altas concentrações de K^+ ou NH_4^+ no meio (Besford et al., 1978; De Kock et al., 1979; Carpena et al., 1986 citados por Dumas, 1990).

Marschner (1995) explica que um incremento na concentração de cálcio na solução externa conduz a um incremento no conteúdo de cálcio nas folhas, mas não necessariamente em órgãos com taxas de transpiração baixa como são os frutos e os tubérculos. Por outro lado, as plantas tem desenvolvido mecanismos para restringir o transporte de cálcio até estes órgãos mantendo uma baixa concentração de cálcio na seiva do floema, através da precipitação do Ca^{2+} como oxalato dentro dos tubos crivosos (Liegel, 1970; Fink, 1991b citados por Marschner, 1995) ou no tegumento das sementes (Mix e Marschner, 1995).

A diluição do conteúdo de cálcio nos tecidos, devido ao crescimento, é outro meio de manter um baixo nível de cálcio. A manutenção desta baixa concentração é necessária para uma rápida expansão celular e uma alta permeabilidade da membrana, tanto nos frutos como nos tecidos de armazenamento (Mix e Marschner, 1976a).

Ho et al., (1993) estudaram também as possíveis causas da podridão apical no tomateiro em relação à absorção e transporte de cálcio. Entre algumas das conclusões do seu trabalho referem que as bases fisiológicas da susceptibilidade à podridão apical é devida a interacção entre o hábito de crescimento do fruto e o ambiente onde a planta cresce. Assim, uma reduzida absorção de cálcio pelas raízes (salinidade, stress osmótico, etc.) ou um fraco transporte de cálcio dentro do fruto, reduzem a concentração do seu armazenamento extra-celular nos tecidos da parte distal do fruto mais que noutras partes do mesmo.

concentração do seu armazenamento extra-celular nos tecidos da parte distal do fruto mais que noutras partes do mesmo.

Uma grande necessidade de cálcio na síntese do plasmalema resultante de uma elevada taxa de alongamento celular, decorrente de um importe elevado de sacarose ou uma elevada temperatura do fruto, poderiam incrementar o deficit existente entre a disponibilidade e a necessidade de cálcio. Assim, uma alta taxa de alongamento e crescimento celular acompanhada por uma taxa de transporte baixa dentro do fruto seriam as bases da susceptibilidade diferencial à podridão apical. No entanto e segundo Ho, et al., (1993) entre as cultivares de tomateiro susceptíveis à podridão apical a importância relativa destes factores podem diferir. Sendo em alguns mais grave a baixa absorção de cálcio pelas raízes e em outros poderia ser mais grave um deficiente transporte de cálcio no xilema dentro do próprio fruto.

Sendo a podridão apical uma das principais causas de perda de frutos nas áreas de produção em Portugal, não existem no entanto trabalhos sobre as causas da variabilidade genética existente entre cultivares resistentes e susceptíveis. Assim o objectivo deste trabalho foi o de investigar as diferenças entre variedades em relação a afinidade ao Ca^{2+} em estádios prematuros da vida duma planta (teste precoce)* e se uma maior afinidade pelo cálcio estaria em concordância com uma manifesta resistência à podridão apical.

A utilização da cultura *in vitro* permitiu controlar a composição mineral dos meios de cultura (particularmente as concentrações de cálcio e as fontes de energia) e manter constantes os factores físicos durante o decorrer das diferentes experiências.

A compreensão dos mecanismos envolvidos na absorção e no transporte de cálcio abre novas perspectivas para a investigação das bases genéticas destas diferenças, e para elaboração de programas de melhoramento genético em relação a este aspecto. Contudo, não é possível discutir as diferenças na afinidade varietal em relação ao cálcio sem um conhecimento aprofundado do metabolismo deste ião na

*

De acordo com o AUPELF, teste precoce é definido como um teste preditor através do qual se antecipa a expressão fenotípica global, aproximando-se o mais possível da informação genética (genótipo) por intermédio de um factor estreitamente correlacionado (frequentemente a resposta é morfológica, fisiológica ou molecular)

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Caracterização do ião cálcio

O cálcio é um catião relativamente grande cujo raio iônico é de 0,412 nm com uma energia de hidratação de 1577 J mol^{-1} (Marschner, 1995). A concentração média de cálcio necessária para um adequado crescimento vegetal é na parte aérea de $0.125 \text{ mmol g}^{-1}$ (5 mg g^{-1}), Brown et al., 1987 citados por Marschner, 1995. Para outros autores os conteúdos médios de cálcio nas plantas variam entre 1 a 3 mg pôr cada 100 mg de matéria seca (Demarty et al., 1984), ou 5-30 mg g^{-1} de matéria seca (Mengel e Kirkby, 1982). Dependendo das condições de crescimento da espécie e do órgão, a concentração de cálcio varia entre 0,1 a 5% do peso da planta (Marshener, 1995).

As plantas típicas de solos calcários (calcícolas) contêm normalmente muito mais cálcio nos tecidos que as de solos ácidos. Nas calcícolas o cálcio pode ser fornecido em altas concentrações podendo alcançar mais de 10% do peso seco, por exemplo nas folhas maduras, sem causar sintomas de toxicidade ou inibição severa do crescimento. Por outro lado, os requerimentos de cálcio para um crescimento ótimo são muito menores nas mono que nas dicotiledóneas, como se mostra na Tabela 2.1. Estas diferenças são um reflexo das necessidades de cálcio a nível dos tecidos, as quais são mais baixas no azevém ($0,7 \text{ mg g}^{-1}$) que no tomateiro ($12,9 \text{ mg g}^{-1}$) para um crescimento máximo relativo de 100. Estas diferenças entre mono e dicotiledóneas têm sido confirmadas em grande número de espécies (Islam et al., 1987, citados por Marschner, 1995).

As duas cargas (+) do ião cálcio fazem dele um elemento facilmente absorvível pelas membranas biológicas, que são geralmente carregadas negativamente. O Ca^{2+} possui igualmente uma tendência para formar complexos organo-metálicos: os *quelatos*. Nas regiões superficiais da célula, ele neutraliza os ácidos pépticos constituintes da lamela média.



Tabela 2.1 - Efeito da concentração de cálcio na solução nutritiva sobre a taxa de crescimento relativa de duas espécies e conteúdos de cálcio nos tecidos da parte aérea.

Cálcio na solução nutritiva (μM)	0,8	2,5	10	100	1000
Velocidade de crescimento					
AZEVÉM	42	100*	94	94	93
TOMATEIRO	3	19	52	100*	80
Conteúdo de Ca^{2+} em mg g^{-1} de matéria seca					
AZEVÉM	0,6	0,7*	1,5	1,7	10,8
TOMATEIRO	2,1	1,3	3,0	12,9*	24,9

Loneragan et al., 1968; Loneragan e Snowball, 1969. Fonte Marshner, 1995.

Na ausência de Ca^{2+} ou em presença de íões oxálicos que o podem precipitar, os tecidos têm tendência a se dissociarem (Heller et al., 1989). Segundo o mesmo autor, a fixação do Ca^{2+} sobre os sítios negativos das cabeças polares dos fosfolípidos membranares tende a aproxima-los, dando-lhes uma maior coesão. Deste modo, o Ca^{2+} diminui a permeabilidade celular, limita a penetração da água e da maior parte dos íões, especialmente do ferro e do potássio. No entanto, o Ca^{2+} aumenta os riscos de carência de elementos necessários as plantas, quando estes estão presentes em pequenas quantidades.

O Ca^{2+} penetra no lume dos vacúolos, preferencialmente nos tecidos adultos, neutralizando os ácidos orgânicos em excesso, precipitando os ácidos oxálico, tartárico e cítrico em cristais; ácidos que são particularmente abundantes nos tecidos velhos, onde as oxidações se realizam deficientemente (Heller et al., 1989).

Os estudos tradicionais sobre o ião focavam principalmente aspectos relacionados com (a) disponibilidade do cálcio no solo, (b) absorção ao nível radicular, (c) transporte e translocação, (d) conteúdo nos tecidos e distribuição na planta, (e) compartimentação do Ca^{2+} na célula e (f) deficiências de Ca^{2+} nos vegetais. Os trabalhos mais recentes sobre o Ca^{2+} nos vegetais tem-se centrado nas suas funções sobre a regulação celular e sobre a sua acção como mensageiro secundário. Estas últimas contribuições tem incrementado grandemente o interesse pelo ião (Ferguson, 1990).

Este trabalho sobre a afinidade do ião cálcio enquadra-se dentro dos aspectos designados de “tradicionais” (absorção, translocação e transporte). Na revisão sobre o Ca^{2+} incluíram-se alguns aspectos sobre a função do mesmo como regulador das respostas celulares aos sinais exteriores (mensageiro secundário) por se considerar que esta ficaria incompleta se não fosse abordado este aspecto fundamental da função do ião cálcio na planta. Por outro lado esta função do ião cálcio permite compreender melhor os aspectos relacionados com a sua compartimentação nas células vegetais.

2 . 2 - Absorção, transporte e translocação do cálcio na planta

A absorção, transporte e distribuição do cálcio na planta seguem sempre as seguintes etapas:

- a) absorção ao nível radicular,
- b) transporte através da raiz até os vasos xilémicos e
- c) movimento até à parte aérea ou até os órgãos de armazenamento.

2 . 2 . 1 - Absorção ao nível radicular

O conteúdo de Ca^{2+} na planta, segundo Loneragan e Snowball, (1969) é controlado fundamentalmente por via genética, sendo pouco afectado pela disponibilidade de cálcio no meio onde se encontram as raízes. Como regra geral, pode-se dizer que existe uma grande discrepância entre a concentração dum elemento mineral no solo ou na solução nutritiva e os requerimentos destes elementos pela planta. Por outro lado existem na solução do solo altas concentrações de elementos minerais que não são necessários para o crescimento vegetal; sendo o mecanismo de absorção dos nutrientes um processo selectivo. Segundo Marschener, (1995) as velocidades com que os diferentes iões são absorvidos depende fundamentalmente da espécie e do ião em causa, como pode ver-se pela Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Variações na concentração dos iões Ca^{2+} e K^+ na solução externa e na seiva das raízes de milho e feijão

	Concentração externa (mM)				
	Inicial	Após 4 dias ^a		Concentração na seiva da raiz (mM)	
		Milho	Feijão	Milho	Feijão
Potássio	2.00	0.14	0.67	160	84
Cálcio	1.00	0.94	0.59	3	10

^a Não foi compensada a água perdida pela transpiração

Fonte: Marschener, 1995.

Os movimentos dos iões e outros solutos de baixo peso molecular desde a solução externa para o interior da parede das células ou raízes (nos espaços intercelulares) é um processo não metabólico (passivo) levado a cabo por difusão ou fluxo em massa. Não obstante, as paredes celulares podem interagir com os solutos, facilitando ou restringindo os movimentos dos mesmos até os sítios de absorção da membrana plasmática das células ou raízes (Marschener, 1995). As paredes das células estão constituídas por uma rede de celulose, hemicelulose (incluindo pectinas) e glicoproteínas. Estas paredes possuem poros de diferentes tamanhos, podendo os maiores chegar a medir 5.0 nm (Carpita et al., 1979). Comparativamente os iões hidratados de cálcio são bastante mais pequenos, sendo 10 a 20% menores que os poros da parede (Tabela 2.3). Deste modo, pode afirmar-se que estes poros (chamados de interfibrilares e espaços intermicelares) não ofereceriam nenhuma restrição ao movimento dos iões nos espaços livres da raiz.

Tabela 2.3 - Tamanho dos poros nas paredes celulares da rizoderme e do córtex e tamanho dos iões cálcio e potássio hidratados.

	Diâmetro (nm)
Parede celular da rizoderme	500-3000
Parede celular do córtex (milho)	100-200
Poros da parede	< 5.0
Sacarose	1.0
Iões hidratados	
Ca^{2+}	0.82
K^+	0.66

Fonte: Marschener, 1995.

Uma porção variável das pectinas da parede celular são ácidos poligalacturónicos que se originam na lamela média. Assim, os grupos carboxílicos ($R.COO^-$) do apoplasto actuam como intercambiadores de catiões.

Nas raízes os catiões da solução externa, como são os catiões cálcio, podem acumular-se nos espaços livres (não metabólicos), os quais não são propriamente espaços livres em que os catiões podem circular livremente; pelo que, Hope e Stevens, (1952) introduziram o termo espaço livre aparente (*Apparent Free Space*, AFS) para o apoplasto. Isto inclui o espaço livre para a circulação da água (*Water Free Space*, WFS), que é acessível aos iões e moléculas com e sem carga, e o espaço livre Donnan (*Donnan Free Space*), onde ocorrem o intercâmbio catiónico e ao mesmo tempo a repulsão dos aniões.

Os catiões bivalentes como o Ca^{2+} são assim preferencialmente ligados a estes sítios de intercâmbio. Existem consideráveis diferenças na capacidade de intercâmbio catiónico (*Cationic Exchange Capacity*, CEC) entre espécies vegetais, isto é o número de catiões intercambiados pelos sítios localizados nas paredes celulares.

Apesar da selectividade da fixação dos catiões pelas paredes celulares, os locais principais da selectividade da absorção de catiões, aniões e a dos solutos encontram-se preferencialmente na membrana plasmática das células da raiz. Esta barreira actua nos dois sentidos, seleccionando por um lado os iões que entram do apoplasto para o citoplasma (influxo) e por outro os iões que saem do citoplasma para o apoplasto ou para solução externa (efluxo).

A outra barreira é o tonoplasto (membrana vacuolar) que no caso do Ca^{2+} é de fundamental importância por ser o destino principal do cálcio livre citoplasmático nas células vegetais (Marschner, 1995).

A membrana plasmática funciona como uma barreira efectiva a difusão e intercâmbio de iões. Isto é demonstrado pelo facto da maioria do $^{45}Ca^{2+}$ absorvido (influxo) encontrar-se ainda intercambiável no espaço livre aparente (apoplasto), passados 30 minutos após a entrada na raiz (Macklon e Sim, 1975, citados por

Clarkson, 1984). Entretanto a maioria do Ca^{2+} encontrado na raiz tinha sido rapidamente trocado com o Ca^{2+} da solução externa, saturando todo o espaço cortical extra celular. A entrada de cálcio no apoplasto, pode ser impedida por catiões, por ex. alumínio, que podem precipitar-se sobre a superfície da raiz (Clarkson, 1984).

2 . 2 . 1 . 1 - Interação com outros iões

Até aqui considerou-se que a absorção do Ca^{2+} é um processo que depende das suas propriedades físico-químicas e da selectividade das membranas celulares das células da raiz. Todavia na solução externa (ou em soluções nutritivas), tanto aniões como catiões estão presentes em diferentes formas e concentrações, pelo que são frequentes interações entre eles durante o processo de absorção (Marschner, 1995). Entre estas interações descrever-se-ão brevemente a competição e o sinergismo do Ca^{2+} com outros iões.

2 . 2 . 1 . 1 . 1 - Competição

O melhor exemplo de competição com o Ca^{2+} é a inibição na absorção do mesmo pelo NH_4^+ (Shaviv et al., 1987). Esta competição entre ambos é devida à concorrência pelas cargas negativas de células individuais, dos tecidos e órgãos (Engels e Marschner, 1993). Por sua vez o Ca^{2+} compete activamente com o Mg^{2+} reduzindo marcadamente as taxas de absorção do mesmo (Marschner, 1995).

2 . 2 . 1 . 1 . 2 - Sinergismo

O sinergismo entre iões é outro aspecto a ter em consideração em estudos de absorção mineral. A estimulação na absorção de catiões pelos aniões e vice-versa é uma consequência da necessidade de manter o balanço de cargas nas células. O sinergismo na absorção pode ser o resultado de um incremento na actividade metabólica das raízes quando os nutrientes são supridos, após um período de restrição.

Um exemplo de sinergismo é o estímulo da absorção de íões e catiões. O Ca^{2+} estimula a absorção líquida de K^+ em condições de baixo pH, principalmente pelo facto de contrapor os efeitos negativos das altas concentrações de H^+ sobre a integridade das membranas e sobre o funcionamento da bomba protónica de efluxo. Quando existe um baixo pH no solo ou na solução nutritiva o Ca^{2+} não só favorece um influxo líquido de K^+ (contra-transporte) mas também de aniões como o Cl^- (Marschner, 1995).

Devido ao seu efeito estabilizador na membrana plasmática, o Ca^{2+} tem um importante papel na selectividade da absorção iónica, especificamente na relação K^+/Na^+ nas raízes. O cálcio actua favorecendo a selectividade pelo K^+ por uma ou várias das seguintes vias: estimulando as bombas de efluxo do ião Na^+ , como contratransporte do K^+/Na^+ , sobre a bomba H^+/Na^+ , ou ainda pelos seus efeitos gerais sobre a integridade das membranas. Quando o cálcio está ausente na solução externa, a selectividade das membranas à absorção iónica diminui, Tabela 2.4; (Marschner, 1995).

As altas concentrações de cálcio são particularmente necessárias para a manutenção da alta selectividade K^+/Na^+ e para a tolerância das plantas à presença de certos sais em excesso.

Tabela 2.4 - Efeito do Ca^{2+} na selectividade das raízes sobre K^+/Na^+ .

Solução externa NaCl+KCl (10 meq .l ⁻¹ de cada)	Taxa de absorção ($\mu\text{eq. g}^{-1}$ peso fresco; 4 h ⁻¹)					
	Milho			Beterraba sacarina		
	Na^+	K^+	$\text{Na}^+ + \text{K}^+$	Na^+	K^+	$\text{Na}^+ + \text{K}^+$
- Cálcio	9	11	20	18.8	8.3	27.1
+ Cálcio ^a	5.9	15.0	20.9	15.4	10.7	26.1

^a0.5 mM CaCl_2 . Fonte: Marschner, 1995

2.2.2 - Transporte do Ca^{2+} através do cortex até aos vasos xilémicos radicais

Clarkson (1984) apresenta uma ampla revisão sobre a passagem do Ca^{2+} pelos diferentes tecidos da raiz até alcançar os vasos do xilema e ser transportado às

diferentes partes da planta. Este autor explica que a entrada de água e Ca^{2+} alcançam os seus valores máximos nas regiões apicais da raiz, sendo fortemente influenciada pelos desenvolvimentos anatómicos da endoderme. Na região apical da raiz as células endodérmicas são grandes, tendo já completado a primeira fase do seu desenvolvimento e possuem a banda de Caspari; os vasos do meta-xilema são completamente conductivos, se bem que o grande xilema central possa ainda não o ser (Sanderson, Whitbread e Fielding, 1983; citados por Clarkson, 1984).

É importante para compreender os argumentos de Clarkson (1984), analisar porquê a banda de Caspari afecta o fluxo apoplástico dos materiais. A banda é por si só uma barreira na qual os poros na parede celulósica estão bloqueados, ou severamente restringidos por deposições de lenhina e suberina. A superfície da banda e o plasmalema das células adjacentes estão firmemente unidos, pelo que resulta impossível ao cálcio atravessar a endoderme pela via apoplástica, consequentemente o Ca^{2+} é desviado para o interior do simplasto das células endodérmicas (Figura 2.1).

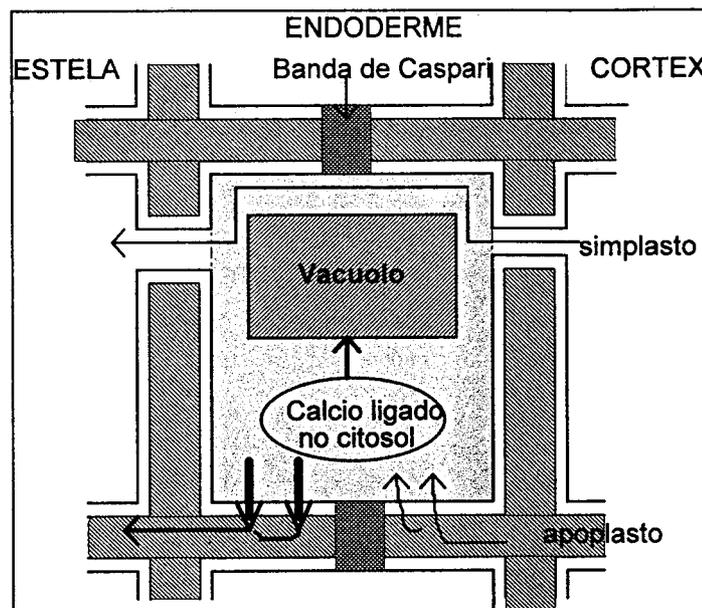


Figura 2.1 - Modelo proposto por Clarkson, (1984) no desvio da direcção dos fluxos de Ca^{2+} do apoplasto para o interior do simplasto das células endodérmicas e subsequente efluxo activo para o interior do apoplasto estelar. A ciclose citoplasmática participaria na transferência do cálcio ligado através do citosol. Fonte: Clarkson, (1984).

Clarkson (1984), explica que, a menos que o citosol das células endodérmicas seja diferente das outras células conhecidas, o cálcio que entra deverá ser rapidamente ligado para evitar a acumulação de Ca^{2+} livre que danifique a célula. O Ca^{2+} que entra no citosol das células endodérmicas será posteriormente descarregado por um efluxo activo no apoplasto da estela. Esta última passagem do Ca^{2+} de dentro das células endodérmicas novamente para o apoplasto localizado do lado interno à banda de Caspari seria devida às bombas de cálcio nas membranas.

Segundo medições das quantidades de Ca^{2+} a diferentes níveis nos tecidos da raiz, Clarkson, (1984) demonstra que a passagem do Ca^{2+} pelas células endodérmicas é bastante rápida e explica que o plasmalema das células endodérmicas seria o ponto de localização da actividade das ATPasas ligadas ao Ca^{2+} .

Esta conclusão provém da observação de que a entrada de Ca^{2+} na raiz não é afectada ou é pouco afectada pelos bloqueadores da respiração, se bem que, a transferência do mesmo até o xilema seja inibida pela acção destes bloqueadores.

Em regiões mais velhas da raiz, uma outra resistência adicional à entrada de cálcio é imposta pela deposição de suberina na lamela media e lenhificação da parede celulósica terciária (Clarkson e Robards, 1975 citados por Clarkson, 1984). Assim, se uma grande parte da endoderme da raiz estivesse suberificada nos eixos principais e nas ramificações, só 10% das necessidades em Ca^{2+} da parte aérea poderiam ser obtidos. Deste modo, quaisquer modificações na condição do solo ou variações a nível ambiental que incrementassem rapidamente a suberificação da raiz produziriam rápidas deficiências de cálcio na planta.

2.2.3 - Movimento do Ca^{2+} até à parte aérea ou até os órgãos de armazenamento

Como para a maioria dos outros iões, o transporte do Ca^{2+} pelo xilema ocorre principalmente por fluxo em massa, pelo que alterações nas taxas de transpiração

têm grande influência na distribuição e acumulação dos iões Ca^{2+} na parte aérea (Epstein, 1972). No entanto, segundo Bell e Biddulph, (1963) as taxas de transpiração não influenciariam o Ca^{2+} do mesmo modo que influenciam outros iões. Assim, a absorção e distribuição do cálcio na planta não estão intimamente relacionadas com a absorção de água nem com a taxa de transpiração (Atkinson, 1991b citado por Atkinson et al., 1992).

Diferentes autores tem explicado o facto do ião cálcio não ser só transportado pelo fluxo em massa, se bem que os movimentos do Ca^{2+} dentro da estela são principalmente apoplásticos.

Os vasos do xilema distribuídos por toda a planta possuem abundantes sítios de intercâmbio para os iões Ca^{2+} e para outros catiões bivalentes, assim estes sítios de intercâmbio ficam fechados quando se dá a sua saturação. A capacidade de intercâmbio do xilema é da ordem de 0,6 a 1×10^{-7} eq. cm^{-2} nos vasos do caule de *Papyrus sp.* (Van de Geijn e Petit, 1979 citados por Clarkson, 1984). Este valor de intercâmbio é muito grande para dever-se a um simples estrato sobre a superfície da parede. Estes autores estimam que a densidade de cargas seria da ordem de 300-500 mol m^{-3} na fase Donnan da parede.

Os iões Ca^{2+} que transporta o xilema são fixados em grande parte pelas cargas negativas das paredes das células xilémicas sendo logo absorvidos pelas células adjacentes (Ferguson e Bollard, 1976; Van De Geijn e Petit, 1979; em Limami e Lamaze, 1991). Desta forma, o cilindro do xilema opera como uma comprida coluna de trocas, sendo a translocação do Ca^{2+} realizada principalmente por processos de intercâmbio, com grupos moleculares de carga negativa, não podendo, pelo tanto ser só explicada em termos de fluxo massivo como anteriormente referido (em Limami e Lamaze, 1991).

De facto, nas plantas em crescimento, o Ca^{2+} é translocado até ao ápice (o qual é um órgão com uma taxa de transpiração extremamente baixa), presumivelmente pela formação de novos sítios de intercâmbio para o ião. Por outro lado, o influxo de Ca^{2+} nas folhas diminui logo que estas alcançam a maturidade,

ainda que a taxa de transpiração das mesmas permaneça constante (Koontz e Foote, 1966, citados por Banuelos et al., 1987). Parece, assim, que as plantas possuem possibilidades adicionais de regulação interna da distribuição do Ca^{2+} para além da sua ligação aos suprimentos de água e movimentos da mesma no xilema (Banuelos et al., 1987).

Em concordância com estas opiniões, Marschner, (1986) explica que a concentração iónica diurna do Ca^{2+} na seiva xilemática não se ajusta aos padrões gerais, para os quais a concentração total de iões está negativamente correlacionada com a transpiração. A um maior fluxo de água durante o fotoperíodo corresponde um decréscimo da concentração iónica; em contraste com estas observações a concentração do Ca^{2+} na seiva xilemática apresenta dois picos diferentes: um durante o dia e outro à noite, não dependentes aparentemente do volume do fluxo no xilema.

Segundo Krug et al., (1972) condições que favorecem altas taxas de transpiração na parte aérea da planta frequentemente diminuem os influxos de Ca^{2+} de órgãos com baixas taxas de transpiração como as rosetas da couve-flor. Nestas condições os fluxos do xilema são dirigidos prioritariamente aos órgãos com taxas de transpiração elevadas, ou seja as folhas exteriores, em detrimento das folhas interiores as quais apresentam sintomas de deficiência por falta de Ca^{2+} .

Em contrapartida em condições de baixa transpiração, a velocidade do volume do fluxo do xilema desde a raiz a parte aérea está determinado por pressão radicular. Deste modo o importe de água e de Ca^{2+} via xilema para os órgãos com taxas de transpiração baixas estão dependentes preferencialmente da pressão radicular. A disponibilidade de água na região onde se encontram as raízes, particularmente durante a noite, é deste modo fundamental para o transporte a longa distancia até aos órgãos em crescimento activo, que apresentam altas demandas de cálcio (Marschener, 1995). Sendo assim, altos potenciais osmóticos na solução do solo (por exemplo em condições de salinidade, ou quando o solo vai secando) diminuem a pressão radicular e os influxos de Ca^{2+} nas folhas novas e nos frutos e

induzem deficiências de cálcio (Bradfield e Guttridge, 1984; Mizrahi e Pasternak, 1985; Berkel, 1988 citados por Marschener, 1995).

A pressão radicular esta fortemente dependente da respiração radicular e dos suprimentos de oxigénio as raízes. Uma interrupção do arejamento na solução nutritiva durante a noite não afecta a acumulação de Ca^{2+} nas raízes de tomate mas afecta principalmente o seu transporte até a parte aérea, que é deste modo reduzido em 42% no caule e em 82% nas folhas (Tachibana, 1991).

Segundo De Guzman e De la Fuente, 1984, a regulação do transporte de Ca^{2+} entre a fonte e o destino, e feita presumivelmente por componentes não vasculares, sendo o ião transportado de célula a célula com um contra-transporte de uma auxina (AIA).

2.2.4 - Regulação hormonal do transporte de Ca^{2+} .

Com vista à uma melhor compreensão dos mecanismos ligados à regulação interna da distribuição do Ca^{2+} na planta, vários autores investigaram a relação entre as hormonas vegetais e o transporte de Ca^{2+} .

Existem vários trabalhos que demonstram uma correlação estreita entre o transporte do Acido Indol Acético (AIA) e o transporte de Ca^{2+} nos tecidos em desenvolvimento. Foram propostas duas interpretações da interacção Ca^{2+} /AIA. A primeira, no qual o ião teria um papel fundamental na secreção basipetala da auxina (De la Fuente, 1984 citado por Brown e Ho, 1993); sendo o Ca^{2+} essencial para manter o movimento polar do AIA (Allan e Rubery, 1991; Lee et. al, 1984; citados por Brown e Ho, 1993).

A segunda proposta, contrária à anterior seria que o transporte do AIA teria influência no transporte do Ca^{2+} para os tecidos em desenvolvimento. Esta estreita interacção entre o AIA e o Ca^{2+} ocorre tanto a nível celular como afecta também a redistribuição e o transporte à distância destas duas substâncias na planta (Tamas, 1995).

Banuelos et al., (1987), estudaram a relação entre o transporte basipetal da auxina e o transporte acropetal do Ca^{2+} até aos frutos de tomate. Observaram uma correlação positiva entre o transporte polar endógeno do AIA fora do fruto de tomate e o transporte de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ para o interior do mesmo fruto (em condição de frutos com taxa de transpiração nula). Assim, explicam que o ambiente natural e as condições de cultura podem afectar o transporte basipetal da auxina (de modo semelhante aos efeitos produzidos pelos inibidores específicos da auxina) e consequentemente contribuir para diminuir a concentração do Ca^{2+} em frutos com baixas taxas de transpiração. Os possíveis mecanismos fisiológicos envolvidos nas interações entre AIA e o íon Ca^{2+} tem sido discutidos em detalhe por Hertel, 1983; De Guzman e Dela Fuente, 1986 e por Tamas, 1995.

Brown e Ho, (1993) que estudaram os factores que afectam o transporte do Ca^{2+} e o movimento basipeto do AIA em frutos de tomate em relação à incidência da podridão apical não encontraram evidências que o movimento basipetal do AIA fosse essencial para a simultânea absorção e transporte do Ca^{2+} até aos frutos de tomate de cultivares com diferente susceptibilidade à podridão apical. Banuelos et al., (1987) concluem que, o nível de Ca^{2+} no fruto seria importante no transporte basipetal do AIA, isto é, o cálcio regularia o movimento da auxina e não ao contrário. Por outro lado estes autores citados por Ho et al., (1993) afirmam que os factores mais importantes que afectariam a absorção de Ca^{2+} e o desenvolvimento da podridão apical, seriam aqueles que influenciam a longo prazo o desenvolvimento de tecido xilémico funcional e a integridade das membranas.

A influência do ácido abscísico (ABA) em regular a entrada de Ca^{2+} no xilema foi testada por Atkinson et al., (1992). Estudos prévios tinham demonstrado que aplicações de ABA nas raízes produziam um incremento na taxa de exudação do xilema de plantas bem regadas quando as mesmas eram decapitadas. Este efeito foi atribuído a modificações temporais na condutividade hidráulica e no balanço iónico (Glinka, 1980; Fiscus, 1981; Anderson e Proebsting, 1984; citados por Atkinson et al., 1992).

As experiências com milho e tabaco realizadas por Atkinson et al., (1992) nas quais 50 cm³ de ABA 10⁻⁴ M foram aplicados com a rega, 30 minutos antes das plantas serem decapitadas, não produziu nenhum efeito na taxa à qual o cálcio foi enviado para o interior do xilema, nem sobre a sua concentração final, ainda que as taxas de exudação das raízes decapitadas fosse aproximadamente o dobro depois do tratamento com ABA.

Segundo Atkinson et al., (1992) o plasmalema na parte interna da endoderme seria o ponto de localização da bomba de regulação do efluxo para o interior do xilema como foi explicado anteriormente por Clarkson, 1988. Alguma coordenação entre o movimento endógeno do ABA desde o interior da raiz para o centro do xilema e o seu efeito no fluxo do cálcio seria devida ao envolvimento do Ca²⁺ nas respostas celulares ao ABA (Mc Ains et al., 1990; Gehring, Irving e Parish, 1990).

2 . 2 . 5 - Transporte de Ca²⁺ pelo floema

Como anteriormente foi referido, o transporte a distancia do Ca²⁺ entre a raiz e a parte aérea, realiza-se predominantemente nos vasos não vivos do xilema; este transporte é unidireccional, isto é, desde a raiz até a parte aérea. Em contraste, o transporte a distancia no floema realiza-se nas células vivas dos tubos crivosos e é bidireccional. A direcção deste transporte esta determinada principalmente pelos requerimentos nutricionais dos vários órgãos e tecidos e ocorre sempre da fonte ao destino.

Por outro lado o transporte via floema é um importante componente no ciclo dos nutrientes minerais entre a parte aérea e a raiz (Marschner, 1995). Durante o transporte, os elementos minerais e os solutos orgânicos são transferidos entre xilema e floema por processos de intercâmbio, denominados de carga e descarga (*loading* e *unloading*). As transferencias são feitas por células específicas chamadas células de transferencia (Pate e Gunning, 1972 citados por Marschner, 1995).

Pelo facto do transporte floemático ser feito em células vivas e dado que o ião cálcio tem uma considerável habilidade de estabelecer ligações cruzadas entre polímeros e de criar estruturas rígidas, os conteúdos de cálcio livre no floema são baixos (Epstein, 1972).

Outra razão para o baixo conteúdo de cálcio livre no floema, apontada por Marschner (1995), é a constituição das placas crivosas que unem os elementos dos tubos crivosos. Os contornos destas placas estão delineados por calose, um polisacárido altamente hidratável, existindo evidências que com elevados conteúdos de Ca^{2+} no floema, a calose pode depositar-se rapidamente, obliterando as placas e conseqüentemente impedindo o transporte a distancia nos tubos crivosos do floema. Sendo assim, só muito pequenas quantidades de Ca^{2+} deveram estar presentes no floema para ser possível o normal funcionamento do transporte a longa distância (Kauss, 1987 citado por Marschner, 1995).

As quantidades de Ca^{2+} presentes no exudado de floema de caules de *Nicotiana glauca* obtido por Hocking, (1980) foi de $83.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ (pH do exudado 7.8-8.0), entretanto para a mesma planta e condições, a quantidade de cálcio no exudado de xilema foi de $189.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ (pH do exudado 5.6-5.9). A excepção do ião Ca^{2+} , a concentração de todos os outros solutos encontrados por Hocking, (1980b) no floema foram varias vezes superiores aos do xilema como se mostra na Tabela 2.5.

Não só as quantidades de Ca^{2+} no floema são baixas, mas também o é a sua mobilidade. Do mesmo modo que o manganês o Ca^{2+} move-se lentamente no floema, pelo que as demandas de Ca^{2+} nos locais de crescimento activo devem ser cobertas pela importação de Ca^{2+} via xilema (Marschner, 1995). As diferenças no transporte de Ca^{2+} entre o xilema e o floema ficam bem evidentes na Tabela 2.6. Estas diferenças são bem evidentes quando comparamos o Ca^{2+} com o K^+ , um dos elementos minerais mais móveis no floema.

Os problemas da falta de Ca^{2+} dos órgãos em crescimento activo (geralmente caracterizados por baixos suprimentos de água via xilema), são agravados pelas quantidades quase desprezíveis que chegam a estes órgãos via floema. Este facto está

na origem das doenças fisiológicas como a podridão apical no tomateiro. Além disso, existe uma correlação negativa entre a velocidade de crescimento e o conteúdo de Ca^{2+} na matéria seca dos frutos em crescimento, não sendo observado isto em relação ao K^+ .

As altas taxas de crescimento que ocorrem nas zonas e órgãos em crescimento activo são devidas a elevados influxos de solutos que transloca o floema e correlacionadas com as elevadas quantidades de K^+ ali encontradas, mas com baixos influxos de Ca^{2+} . Por outro lado e como referido anteriormente, nos órgãos com taxas de transpiração baixa, as altas taxas de solutos que a eles chegam via floema diminuem ou ainda invertem a direcção dos fluxos do xilema (Mix e Marschner, 1976c citados por Marschner, 1995). Este contrafluxo da água no xilema pode ser significativo como ocorre nos bagos de videira (Lang e Thorpe, 1989 citados por Marschner, 1995) ocasionando a saída de cálcio e outros solutos destes frutos (Mix e Marschner, 1995).

Tabela 2. 5 - Comparação dos níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em exudados de floema e xilema de *Nicotiana glauca*.

Substancia	Exudado de floema (incisão de caule) pH 7.8-8.0 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ^b	Exudado de xilema (traqueia) pH 5.6-5.9 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ^b	Razão concentração floema/xilema
Matéria seca	170-196 ^c	1.1-1.2 ^c	155-163
Sacarose	155-168 ^c	ND	—
Comp. aminados	10 808.0	283.0	38.2
Nitratos	ND	NA	—
Amónio	45.3	9.7	4.7
Potássio	3673.0	204.3	18.0
Fósforo	434.6	68.1	6.4
Cloreto	486.4	63.8	7.6
Enxofre	138.9	43.3	3.2
Cálcio	83.3	189.2	0.44
Magnésio	104.3	33.8	3.1
Sódio	116.3	46.2	2.5
Ferro	9.4	0.60	15.7
Zinco	15.9	1.47	10.8
Manganês	0.87	0.23	3.8
Cobre	1.20	0.11	10.9

Extraído de Marschner, 1995. ^a Hocking (1980). ^b ND. quantidades não detectáveis; NA, não existem dados disponíveis. ^c em mg ml^{-1} .

Tabela 2.6 - Importes de K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} pelo ápice terminal e folhas jovens de rícino, *Ricinus communis* (Ricino)

	Rebento terminal			Folhas jovens		
	K	Mg	Ca	K	Mg	Ca
Xilema	3.9	8.0	4.2	20.6	5.2	2.4
Floema	20.4	2.0	0.03	19.3	2.0	0.03

Extraído de Marschner, 1995. Os dados estão em μmol por planta para 9 dias. Os dados foram recalculados a partir dos trabalhos de Jeschke e Pate (1991b)

2.3 - Compartimentação intra e extra celular do Ca^{2+} .

A distribuição típica do cálcio em células de tecidos vegetais completamente desenvolvidos e portanto com alta capacidade de intercâmbio catiónico nas paredes celulares é mostrada na Figura 2.2.

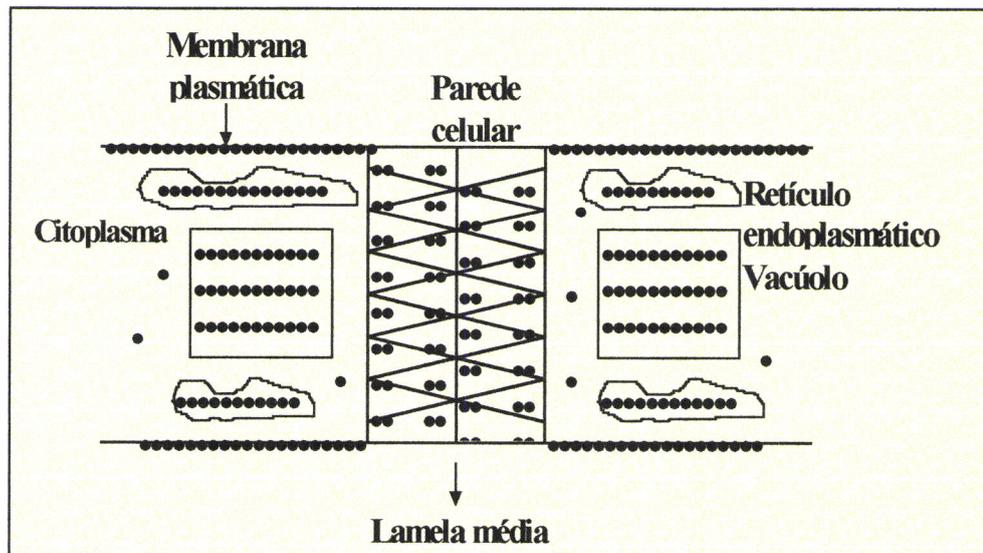


Figura 2.2 – Representação esquemática de duas células adjacentes com a distribuição típica de Ca^{2+} (●). Marschner, 1995.

Como pode ver-se na Figura, existem zonas de alta concentração de cálcio e outras zonas com uma concentração muito baixa. Altas concentrações encontram-se na lamela média da parede celular, no exterior da membrana plasmática (MP), no retículo endoplasmático (ER) e nos vacúolos (Marschner, 1995).

Tanto a localização como os potenciais electroquímicos que existem nas membranas dos constituintes celulares são de fundamental importância para o normal funcionamento e regulação dos contínuos processo metabólicos que ocorrem no citoplasma e organelos. Ainda que os gradientes de cálcio sejam relativamente estáveis, estes são estabelecidos por um balanço dinâmico de influxos e efluxos através de cada uma das membranas celulares (Busch, 1995).

2.3.1 - Vacúolos

Os vacúolos, devido ao seu grande tamanho relativo, constituem o mais importante reservatório do Ca^{2+} celular, permitindo a homeostase do Ca^{2+} citosólico. O Ca^{2+} vacuolar pode variar entre centos de micromoles a quantidades milimolares (Bethke et al., 1995). A diferença de potenciais electroquímicos ($\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$) através do tonoplasto (TP) pode ser calculada em 28-34 KJ mol^{-1} . Em células não estimuladas, grandes fluxos de Ca^{2+} ocorrem através do TP, similares em magnitude àqueles que ocorrem na MP. Em células estimuladas por sinais externos (ver secção 2.6.3), ocorrem câmbios no potencial do TP, que fazem libertar para o citoplasma o Ca^{2+} armazenado no vacúolo. Porém, segundo Bush, (1995) é necessário mais informação para se conhecer os câmbios que estes sinais provocam no potencial eléctrico desta membrana.

2.3.2 - Retículo endoplasmático:

O retículo endoplasmático (RE), do mesmo modo que o vacúolo, funcionaria como depósito intracelular de Ca^{2+} . Não tem sido possível até ao momento determinar com exactidão as quantidades de Ca^{2+} do lume reticular; no entanto pensa-se que nele existiriam elevados níveis de Ca^{2+} , mas não ultrapassando os 50 μM . O RE das células de aleurona de cevada contem níveis milimolares de Ca^{2+} , com valores na concentração de Ca^{2+} livre que alcançam os 5 μM (Bush et al. 1989,

Busch et al., 1993 citados por Bethke et al., 1995). Medições dos efluxos de Ca^{2+} de vesículas de RE, indicam que existe um rápido intercâmbio de Ca^{2+} através da membrana do mesmo; estes dados sugerem que o nível de Ca^{2+} do RE é mantido pelo balanço entre rápidos processos de efluxos e influxos. No entanto a importância do RE como fonte de Ca^{2+} em células estimuladas por sinais externos (ver secção 2.6.3) e a sua participação nos processos de resposta-estímulo não é conhecida (Bush, 1995).

As superfícies do RE excedem grandemente as quantidades de cálcio vacuolar, mas não existe evidência que este armazenamento ao nível do retículo contribua para manter a homeostase do Ca^{2+} citosólico (Bethke et al., 1995).

2.3.3 - Plastídios e Mitochondria

Os cloroplastos e as mitochondrias também contêm níveis milimolares de Ca^{2+} e segundo alguns investigadores estes dois organelos possuem um importante papel na homeostase cálcica (Burchert et al, 1990; Dieter e Marme 1980; Kreimer et al., 1988; citados por Bethke et al., 1995). Todavia, existem ainda muitas dúvidas sobre a magnitude das diferenças de potenciais electroquímicos ($\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$), nas membranas externas dos plastídios e mitochondria, porém não parece provável que tenham a mesma importância das que ocorrem através da MP, TP, e RE.

Os cloroplastos e as mitochondrias contêm níveis milimolares de Ca^{2+} total, se bem que ligado aos fosfatos e lípidos membranares. Os aumentos de Ca^{2+} que ocorrem no interior dos plastídios e mitochondrias relativamente ao Ca^{2+} do citosol, são atribuídos a um balanço nos potenciais da membrana que se incrementa como resultado da fotossíntese ou da respiração.

Diferenças transitórias de potenciais electroquímicos ($\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$) permitem a entrada de consideráveis quantidades de Ca^{2+} nos cloroplastos em células expostas a luz. No caso dos plastídios o incremento de Ca^{2+} interno estaria relacionado com determinados processos como a expressão génica (Bush, 1995).

2.3.4 - Núcleo

Não tem sido possível até agora penetrar no invólucro do núcleo para medir os níveis de Ca^{2+} do mesmo. As técnicas por imagem não mostram nenhuma diferença entre o conteúdo de Ca^{2+} do núcleo e do citosol que o rodeia. Este facto não é estranho pois, se considera que os poros do invólucro do núcleo possuem tamanho suficiente para permitir movimentos difusivos de Ca^{2+} entre um e outro lado. Trabalhos recentes em células animais indicam a existência de câmbios no conteúdo Ca^{2+} dos núcleos, câmbios que podem ser maiores ou menores do que as trocas que ocorrem simultaneamente no citosol que o rodeia. Estas observações terão que se confirmadas segundo Bush, 1995.

2.3.5 - Citosol

Em contraste com as elevadas concentrações de cálcio que se encontram no retículo endoplasmático e nos vacúolos, a concentração de Ca^{2+} livre no citosol é extremamente baixa, sendo raramente superior a $1\mu\text{M}$

Para avaliar o conteúdo de Ca^{2+} livre no citoplasma de células vegetais existem uma série de condicionantes, uma delas é sem dúvida a presença tanto da parede celular como do vacúolo, que dificultam a colocação dos microelectrodos necessários para a medição dos iões de Ca^{2+} livre do citoplasma.

Recentemente, diferentes autores, utilizando diferentes técnicas, tem feito estimativas dos conteúdos de Ca^{2+} no citoplasma de células de tecidos vegetais, que indicam que a concentração de Ca^{2+} intracelular nestas células é mantida a níveis nano-moleculares médios (Tabela 2.7)

Imagens de Ca^{2+} no citosol indicam que a sua concentração não é a mesma em todas as partes do citosol. Estes gradientes de Ca^{2+} citoplasmático são segundo Bush, (1995) importantes para o funcionamento normal da célula e especialmente para a “transdução” de sinais externos.

Tabela 2.7 - Estimações da concentração de Ca^{2+} livre no citosol de tecidos vegetais

TECIDO	CONC.	REF.
Protoplastos cenoura	360 nM	1
Protoplastos cenoura	120-360 nM	2
Protoplastos cevada	<200 nM	3
Protoplastos aleurona de cevada	250 nM	3
Tradescantia pelos do estame	<1.0 μM	4
Chara entrenó	220 nM	5
Nitella entrenó	250-400 nM	
	145 nM	6
Zea pelo radicular	145-231 nM	7
Zea coleoptiles	84-143 nM	8

1-Gilroy, Hughes e Trewavas (1987); 2- Gilroy, Hughes e Trewavas (1989); 3- Bush e Jones (1987); 4- Hepler e Callahan (1987); 5- Williamson e Ashley (1982); 6- Miller e Sanders (1987); 7- Felle (1988a); 8- Felle (1988b); Fonte: Evans et al. (1991).

2.3.6 - Membrana plasmática

O mais alto potencial electroquímico na célula é o que existe através da membrana plasmática (MP). Em células não estimuladas, os níveis de Ca^{2+} citosólico são da ordem de 10^{-7}M , e o nível do Ca^{2+} no apoplasto de plantas terrestres varia entre 10^{-4} e 10^{-3} M. Os potenciais eléctricos (Ψ_{mp}) através da membrana plasmática variam entre -150 a -200 mV, e a diferença de potenciais electroquímicos ($\Delta\mu\text{Ca}^{2+}$), calculados pela equação de Nernst é de 45-60 KJ mol^{-1} .

O Ca^{2+} livre do citosol e o Ca^{2+} extra-celular estão em equilíbrio com uma maior reserva de cálcio que se encontra ligado aos polisacáridos, lípidos e proteínas. Estímulos que alterem os potenciais eléctricos (Ψ_{mp}), ou o pH da parede celular podem mobilizar o Ca^{2+} da parede incrementando as diferenças de potencial através da MP, alterando, portanto, os fluxos de Ca^{2+} através da mesma. Pequenos câmbios nos influxos ou efluxos de Ca^{2+} através da membrana, produzidos em resposta a sinais, (ver secção 2.6.3) podem alterar significativamente os conteúdos de cálcio livre do citosol (Bush, 1995).

2.3.7 - Parede celular

Em contraste com outros macronutrientes, a maior parte do cálcio de uma planta localiza-se frequentemente nas paredes celulares. Esta particularidade na sua distribuição é consequência da abundância de sítios de ligação que o Ca^{2+} encontra nas paredes. Os reservatórios de cálcio na parede celular são também importantes para a manutenção da homeostase das células vegetais. Na parede celular encontram-se concentrações milimolares de cálcio e dependendo do pH e das propriedades de carga da parede, a concentração no apoplasto de células em crescimento é estimado em 100 a 200 μM (Cleland et al., 1990 citados por Bethke et al., 1995).

As interacções entre os iões de cálcio e as paredes celulares desempenham um papel fundamental na fisiologia da planta. Os iões de cálcio estão envolvidos em vários mecanismos fisiológicos como: a estabilização da estrutura das paredes celulares, o crescimento por acidificação, o controlo das enzimas da parede, etc. Todas estas funções resultam da estreita ligação dos iões às pectinas presentes nas paredes celulares. Devido à sua forte ligação com os grupos carboxílicos dos ácidos pécticos, os iões Ca^{2+} actuam na parede de maneira similar aos H^+ . Assim, controlam a densidade de carga da parede, a qual está directamente correlacionada com a selectividade iónica da parede e com o seu grau de turgescência, (Demarty et al., 1984).

2.4 - Processos intra e extra celulares mediados pelo Ca^{2+} .

2.4.1 - Estabilização da membrana plasmática pelo Ca^{2+} .

O ião cálcio estabiliza a membrana unindo os fosfatos e grupos carboxílicos dos fosfolípidos e proteínas (Caldwell e Haug, 1981), preferencialmente na superfície das membranas (Legge et al., 1982). Ao nível destes sítios de ligação produzem-se intercâmbios entre o cálcio e outros catiões, como por exemplo K^+ , Na^+ ou H^+ . O intercâmbio do Ca^{2+} (ligado à membrana) por altas concentrações de Na^+ é

o factor mais importante envolvido no *stress* por salinidade (Lynch et al., 1987; Rengel, 1992b, citados por Marschner, 1995).

Para realizar as suas funções ao nível da membrana plasmática, o Ca^{2+} deverá estar sempre presente na solução externa, onde regula a selectividade da absorção iónica e evita a perda dos solutos do citoplasma. O efeito protector do Ca^{2+} nas membranas é de fundamental importância em condições de *stress*, como por exemplo o provocado por baixas temperaturas e anaerobiose, minorando os danos causados pelas geadas (Marschner, 1995).

Em tecidos deficientes em cálcio o dano na integridade das membranas provoca um incremento na velocidade da respiração; este facto está relacionado com um aumento na perda dos substratos da respiração dos vacúolos pelas enzimas respiratórias do citoplasma (Bangerth et al., 1972).

Segundo Marschner (1995), o ião cálcio não só protege os lípidos da membrana, como participa também no aumento da ruptura das membranas dos corpos lipídicos dos cotilédones durante a germinação das sementes, como é o caso das sementes de *Ricinus sp.* Pelo menos duas enzimas lipofíticas associadas com corpos proteicos são estimuladas pelo cálcio ou pela calmodulina (ver secção 2.6.1).

O Ca^{2+} estimula também uma certa quantidade de enzimas ligadas à membrana, particularmente ATPases da membrana plasmática das raízes de certas espécies (Kuiper e Kuiper, 1979).

2.4.2 - Estabilização da estrutura da parede celular pelo Ca^{2+} e crescimento celular

O crescimento das células vegetais é promovido pela extensão da parede devido à pressão de turgescência. O processo começa pela perda da rigidez da parede celular, permitindo assim o seu alongamento. Todavia, os mecanismos da indução do crescimento ácido ou pela acção do AIA, não estão completamente elucidados; sabe-se no entanto que catiões bivalentes como o Ca^{2+} impedem o enfraquecimento da

parede e a subsequente extensão celular. Demarty et al., (1984) explicam que a inibição do crescimento não é o resultado de processos de gelificação da parede celular produzidos pelo íon cálcio, mas sim pela grande afinidade do mesmo com os grupos urónicos. Esta afinidade provoca a substituição nos grupos urónicos dos H^+ da parede, modificando o pH local, o que, por sua vez, modificaria a actividade das enzimas da parede, interferindo assim no alongamento celular.

Virk e Cleland, (1988), discutem amplamente a função dos H^+ e do Ca^{2+} na modificação da extensibilidade das paredes e o seu efeito no alongamento celular. Segundo estes autores as paredes celulares conteriam vários conjuntos de “ligações de alta resistência” (LAR), que controlariam a extensibilidade da parede.

Para Virk e Cleland, (1990), as paredes celulares conteriam vários conjuntos de ligações de alta resistência. Um conjunto destas ligações, ainda não identificado, seria destruído em resposta à condições de acidez, sendo provavelmente o principal conjunto de ligações destruído na indução de crescimento por fusicoccina.

Um segundo conjunto de LAR são as pontes de cálcio, muitas das quais dão uma contribuição escassa à resistência da parede. No entanto, a remoção destas ligações de cálcio potenciaria a ruptura das LAR sensíveis aos ácidos.

Um terceiro conjunto de LAR estaria envolvido na indução do crescimento pela acção auxínica (Theologis, 1988 citado por Cleland, 1990). Estas últimas não são ligações cálcicas, portanto a remoção de quase todo o cálcio contido na parede com Quin-2 (agente quelatizante do cálcio) não provoca o mesmo efeito na extensibilidade da parede como o induzido pela acção das auxinas. Assim a parede celular actua como se fosse composta de uma série de micro-domínios, cada um deles delimitado pelas ligações de alta resistência que o rodeiam (Cleland, 1987).

Outros contributos importantes para uma maior compreensão das funções do Ca^{2+} na parede celular e nos efeitos da concentração de Ca^{2+} na síntese da parede são referidos nos trabalhos de Demarty et al., (1984) e Eklund et al., (1990).

Muitos modelos estabelecem uma ligação entre o crescimento diferencial e a redistribuição do Ca^{2+} na zona de alongamento (por ex. Clarckson, 1984; Poovaiah,

Mc Fadden e Reddy 1987; Roux e Serlin, 1987; Arslan - Cerim, 1966; Goswami e Audus, 1976; Migliaccio e Galston, (1987) citados por Bagshaw e Cleland, 1993). Contrariamente, Hasentein et al., (1988) e Lee et al., (1983b) citados por Bagshaw e Cleland, (1993) explicam que o estabelecimento de gradientes de Ca^{2+} através das zonas de alongamento de raízes de milho ou de ervilha não causaram crescimento diferencial pelo que pouca ou nenhuma curvatura foi observada nestas raízes em crescimento.

Bagshaw e Cleland, (1993) explicam que as paredes das células epidérmicas que controlam o crescimento não são endurecidas por altas concentrações de Ca^{2+} , e nem foram danificadas pela remoção de consideráveis quantidades de Ca^{2+} (mais de 45%). Por outro lado, estes autores demonstraram que o crescimento e a gravicurvatura de hipocótilos não foram afectados pela saturação com Ca^{2+} dos tecidos epidérmicos. Sugerem assim, a impossibilidade do Ca^{2+} desempenhar um papel significativo durante a fase de reacção da gravicurvatura.

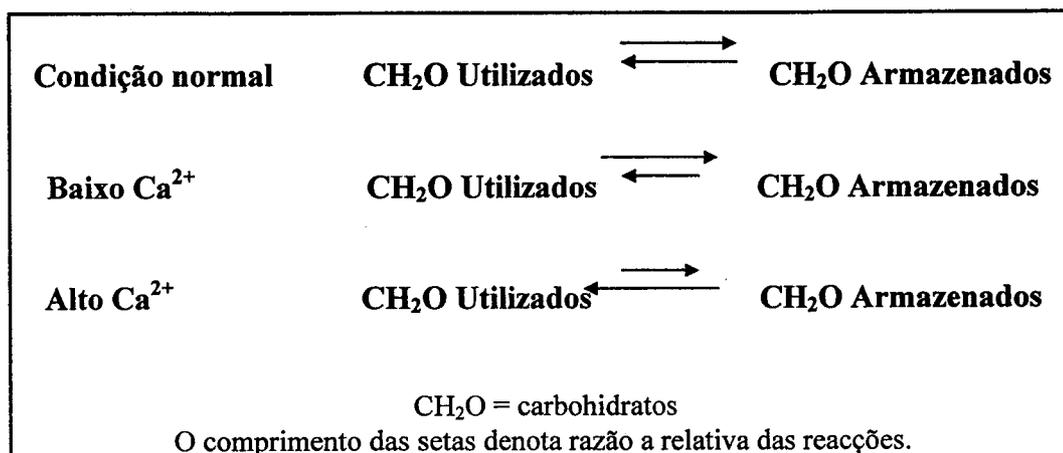
2.4.3 - Efeitos do Ca^{2+} no metabolismo dos carboidratos

A construção das estruturas celulares e a capacidade de alongamento e divisão celular estão dependentes tanto da presença de carboidratos como da disponibilidade de cálcio (Marme, 1983; Demarty et al., 1984; Burstrom, 1968; citados por Greger e Bertell, 1992).

Segundo Marschner, (1978) uma baixa concentração de Ca^{2+} nos órgãos de armazenamento induzem a uma alta permeabilidade da membrana facilitando deste modo a difusão dos solutos para o interior do tecido. Assim um baixo conteúdo de Ca^{2+} promoveria a acumulação de açúcar nos órgãos que armazenam grandes quantidades do mesmo, transportado até ali pelo floema.

Greger e Bertell, (1992) estudaram o efeito do Ca^{2+} e do Cd^{2+} no metabolismo dos hidratos de carbono. Segundo estes autores, o metabolismo dos hidratos de carbono é indirectamente afectado pela presença de cálcio. Em presença de baixas

quantidades de Ca^{2+} nos tecidos, o crescimento das plantas de beterraba foi retardado e os níveis de carboidratos incrementados. Efeito contrário foi verificado com altas concentrações de cálcio. Os resultados do trabalho de Greger e Bertell, (1992) sugerem que os níveis de Ca^{2+} modificam a distribuição dos hidratos de carbono entre os órgãos em crescimento e os de armazenamento. Os efeitos a longo prazo do Ca^{2+} sobre o balanço dos carboidratos entre aqueles utilizados para a manutenção e crescimento e os armazenados podem ser representados esquematicamente como se segue:



Fonte: Greger e Bertell, 1992.

Segundo este esquema a taxa de absorção de sacarose é reduzida nos tecidos de armazenamento das raízes quando o Ca^{2+} é baixo; isto é devido a um baixo gradiente de concentração que é seguido de um alto armazenamento de carboidratos.

O trabalho efectuado por Matsumoto e Taraoka, (1980) em *Cucumis sativus* mostrou que os açúcares solúveis se acumulavam drasticamente nas folhas, e decresciam nas raízes quando as plantas cresciam em condições de pouca disponibilidade de Ca^{2+} no meio; no entanto não houve alterações qualitativas entre os açúcares solúveis.

Schulte-Baukloh e Fromm, (1993) investigaram os efeitos das deficiências de Ca^{2+} na partição dos fotoassimilados e na distribuição mineral no floema de *Populus*

e não encontraram alterações específicas entre os açúcares solúveis em plantas com carência de Ca^{2+} . Estes autores explicam que baixos conteúdos de Ca^{2+} não afectam os caminhos do metabolismo dos carboidratos, mas sim o seu transporte.

No trabalho acima citado foi comprovado que, quando as árvores de *Populus* crescem em meios com deficiência de Ca^{2+} , apareceram sintomas desta deficiência nas folhas, e as quantidades de ^{14}C assimilado e transportado pelo floema foram reduzidas.

Em concordância com os trabalhos que relacionam o ião cálcio aos carboidratos pode-se dizer que a influência do Ca^{2+} realiza-se alterando o transporte entre a fonte e o destino dos carboidratos na planta. Schulte-Baukloh e Fromm, (1993) explicam que, no caso das plantas de *Populus* submetidas a deficiência de Ca^{2+} no meio, reduziram drasticamente as quantidades de Ca^{2+} transportadas pelo floema incrementando simultaneamente as quantidades de Mg^{2+} e de P tanto nas paredes como no citoplasma dos tubos crivosos do floema. Segundo estes autores, isto representa uma clara evidência que a reduzida translocação dos carboidratos no floema não depende só de uma diminuição das concentrações de Ca^{2+} , mas também dos incrementos dos iões magnésio e fósforo.

Câmbios na distribuição transmembranar de iões pode afectar a entrada de solutos para o floema (Delrot, 1989 citado por Schulte-Baukloh e Fromm, 1993). Em relação ao Mg^{2+} é sabido que nos vegetais, este interfere com a nutrição do Ca^{2+} . Em baixas concentrações estimula a actividade das ATPases, no entanto em concentrações elevadas (mais de 3 mol m^{-3}) tem um efeito inibidor (Walker e Leigh, 1981 citados por Schulte-Baukloh e Fromm, 1993). Assim os efeitos de inibição das ATPases por grandes quantidades de Mg^{2+} é segundo estes autores, uma outra evidência que o efeito na traslocação do floema não é uma causa directa das baixas quantidades de Ca^{2+} , mas sim das alterações que isto provoca nas quantidades de outros iões especialmente no excesso de Ca^{2+} .

Para além destes processos descritos, outros processos celulares são mediados pelo ião Ca^{2+} , tais como o crescimento polarizado da célula, a mitose e a citocinese,

a corrente citoplasmática, a fusão protoplasmática, a regulação do volume celular das células guarda, o movimento circadiano das folhas, etc. Uma extensa revisão sobre estes processos mediados pelo Ca^{2+} encontra-se no trabalho de Wayne, (1985).

2.5 - Homeostasia cálcica (Mecanismos da regulação do Ca^{2+})

Actualmente não existem dúvidas de que as células vegetais mantêm a concentração interna de Ca^{2+} livre dentro de limites muito estreitos, raramente excedendo $1\mu\text{M}$; enquanto que no apoplasto situado a uns poucos nanómetros de distância (para fora da membrana plasmática) a concentração do ião é de 10^3 a 10^4 vezes maior.

Os suprimentos de Ca^{2+} que chegam às células foliares, transportados até ali durante o dia pela corrente transpiratoria (assumindo que os sítios de intercâmbio no espaço livre estão saturados de Ca^{2+}) esta compreendido entre 50 a $100\mu\text{M}$, sendo a concentração de Ca^{2+} maior durante a noite devido a pressão radicular (Atkinson et al., 1991 citado por Ramon et al., 1993). Pelo facto das raízes não poderem descarregar o Ca^{2+} não desejado directamente na solução do solo e de existir pouca oportunidade para exportar o mesmo para o floema, os excessos de Ca^{2+} que chegam às células foliares devem assim ser transportados para o interior dos vacúolos (Shumaker e Sze, 1986).

Nos vacúolos os iões cálcio podem precipitar como oxalato ou serem ligados ao malato ou citrato. No entanto é inevitável que exista um fluxo de Ca^{2+} desde os vacúolos para o citoplasma, assim como um influxo através da membrana plasmática. A manutenção a longo prazo da homeostasia cálcica no citoplasma depende assim da actuação de mecanismos energéticos que actuam expelindo o Ca^{2+} do citoplasma contra de um gradiente de energia livre bastante grande (usualmente maior que 40 KJ mol^{-1}) Ramon et al., (1993).

Por outro lado Bethke et al., (1995) explicam que a energia metabólica em forma de ATP depende de grandes fontes de iões fosfato livres, devido a este facto a

concentração intracelular de cálcio livre $[Ca^{2+}]_i$ deve ser mantida muito baixa de maneira a evitar a formação de sais de fosfato de cálcio. Esta necessidade bioquímica da manutenção de baixos níveis de Ca^{2+} no ambiente citosólico rico em PO_4^- é possível pela actuação do anteriormente citado sistema homeostático.

Os componentes do sistema homeostático são: as bombas, os transportadores secundários e os canais iónicos (Figura 2.3). Em conjunto formam um complexo sistema para a regulação da função celular permitindo flutuações controladas dos níveis de Ca^{2+} citosólico, (Bush, 1995).

Funcionalmente estes transportadores dividem-se em duas classes: os que participam nos **efluxos** do Ca^{2+} para fora do citoplasma (Ca^{2+} ATPases e Ca^{2+}/nH^+ “antiportadores” (*antiporters*) e os que actuam nos **influxos** de Ca^{2+} (canais de Ca^{2+}). A utilização de membranas isoladas e da técnica do *patch-clamp* tem permitido a caracterização das actividades destas duas classes de transportadores, (Bush, 1995).

2.5.1 - Transportadores de efluxo

2.5.1.1 - Bombas de Ca^{2+}

ATPases. (Transporte Activo de Ca^{2+} Pelas Membranas Celulares).

As Ca^{2+} ATPases que mediam os efluxos de Ca^{2+} do citosol parecem pertencer a um antigo e diverso grupo evolutivo de bombas iónicas chamadas ATPases do tipo-P (Figura 2.3; 2), que formam um intermediário fosforilado durante o transporte. Esta fosforilação e por conseguinte o transporte activo destas bombas é inibido pelo vanadato (*vanadate*).

O transporte activo de Ca^{2+} com estas características (ATPases do tipo-P), tem sido encontrado nas preparações de quase todo tipo de membranas vegetais (células radiculares de mono e dicotiledóneas, folhas, cotilédones, coleótilos e aleuronas).

Para além das características citadas, que são indicativas das ATPases do tipo-P, estas Ca^{2+} ATPases vegetais possuem alta afinidade pelo Ca^{2+} , um pH óptimo entre 7.0 e 7.5, sendo inibidas pela erotrosina B. Possuem também baixa

especificidade pelo ATP como substrato para formação da fosfoenzima e transporte (Chen, et al., 1993 e Williams et al., 1990 citados por Bush, 1995).

ATPases estimuladas pela CaM (equivalentes as do tipo MP das células dos mamíferos), foram purificadas primeiramente em coleoptiles de milho. Possuem uma massa molecular de 140 kDa e uma antigenicidade comum com as proteínas animais. Este tipo de ATPases foram encontradas principalmente no retículo endoplasmático e no tonoplasto e mais raramente na membrana plasmática. Nas Tabelas 2.8 e 2.9 resumem-se as propriedades da actividade das ATPases estimuladas pela calmodulina ao nível da membrana plasmática de células vegetais.

Os mecanismos de transporte de Ca^{2+} dependentes do ATP tem sido descritos como estritamente dependentes do Mg^{2+} , mas são menos específicos por nucleótidos que as H^+ -ATPases, pois, para além, de usarem ATP como substrato, também podem fazer uso do Inositol 5' Trifosfato (ITP) ou da Guanosina Tri Fosfato (GTP) (Giannini et al., 1987, Gräf e Weiler 1989, Williams et al., 1990 citados por Ramón et al., 1993).

Em 1993, Askerlund e Evans, demonstraram pela primeira vez dois diferentes intermediários fosforilados obtidos da membrana plasmática, as Ca^{2+} ATPases e as H^+ ATPases. Do mesmo modo, Vicente e Vale (1995), demonstram a actividade dos $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ e das ATPases do tipo P, em vesículas da membrana plasmática de raízes de milho.

A importância das Ca^{2+} ATPases na regulação do Ca^{2+} em células vivas tem sido inferido pela sua abundância, localização intracelular e afinidade pelo Ca^{2+} .

Um segundo grupo de Ca^{2+} ATPases que não são estimuladas pela CaM, foram igualmente identificadas nas plantas. Gianini et al. (1987), citados por Bush (1995), propõem que estas seriam do tipo RE (encontradas em células animais), pelo facto destas ATPases não serem estimuladas pela CaM, e pela formação de uma fosfoenzima de 100-kDa de massa similar à ATPase do retículo sarcoplásmico (RS).

No entanto, será necessária uma caracterização mais apurada para determinar se estas ATPases insensíveis à CaM são de facto enzimas do tipo RE, (Bush, 1995).

Tabela 2.8 - Propriedades dos transportadores de Ca^{2+} nas membranas de células vegetais.

CÉLULAS	pH ÓTIMO	ESPECIFICIDADE	INIBIDORES	ESTIMULAÇÃO PELA CaM	M_R
Milho	7,2-7,5	Basal:75%GTP 55%UTP 50%ITP +CaM 0%GTP 0%UTP 0%ITP	Vanadato Lantânio	Sim	140.000
Rabanete	7,5	---	Vanadato Eritrocina B	Não (?)	280.000

Fonte: Evans et al., 1991

Tabela 2.9 - Bombas de Ca^{2+} estimuladas pela calmodulina (CaM) identificadas em membranas vegetais intracelulares.

Parâmetro	Cenoura ¹	<i>Brassica</i> ²	Cevada ³	Milho ⁴	Milho ⁵
Células	Células em suspensão	Inflorescências	Aleurona	Raízes	Rebentos estiolados
K_m Ca	1-2 μM	+CaM=0.6 μM	500 nM	5 μM	ND
pH ótimo	ND	c7-7.5	ND	ND	7-7.5
Especif. nucleótidos	ATP(100)>GT P (80)	ATP(100)>ITP= GTP(45)>UTP= CTP (10)	ND	ATP(100)>UT P=ITP (10)	
Estimulação pela CaM	Sim (3-4x)	Sim (5x)	Sim(2-6x)	Sim (3x)	Sim(2-3x)

ND: não determinado. (1) Hsieh et al., 1991; (2) Askerlund e Evans, 1992; (3) Gilroy e Jones, 1993; (4) Brauer et al., 1990; (5) Theodoulou, 1992. Fonte: Evans, 1994.

2.5.1.2 – “Contraportadores” (*antiporters*)

Uma segunda classe de transportadores que intervém no efluxo do Ca^{2+} nas células vegetais são os $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ (Figuras 2.3; 6). Estes “contraportadores” (*antiporters*) são transportadores secundários que não requerem ATP para o transporte e podem usar qualquer um dos componentes da força motriz protônica (pmf) tais como: os gradientes de pH, ΔpH (Schumaker e Sze, 1986 citados por Bush, 1995) ou os gradientes de potencial elétrico, $\Delta\psi$ (Blackford et al., 1990 citados por Bush, 1995) para conduzir o Ca^{2+} .

Para diferenciar estes transportadores das Ca^{2+} ATPases tem-se usado como inibidor do transporte de Ca^{2+} o protonosforo (*protonophore*) em lugar do vanadato.

O requerimento da força motriz protónica (pmf) por parte destes transportadores para conduzir o Ca^{2+} restringiria a sua presença nas membranas com bombas de H^+ . Assim a membrana plasmática, o tonoplasto e o retículo de Golgi, são as possíveis localizações para os $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ (Bush, 1995).

Estudos *in vitro* tem mostrado duas propriedades fundamentais dos “contraportadores” que são importantes para compreender o seu papel na regulação do Ca^{2+} . Estas propriedades são: a sua baixa afinidade pelo Ca^{2+} e um intercâmbio de mais de dois H^+ por cada Ca^{2+} transportado. Análises cinéticas da actividade dos contraportadores em preparações de membranas de aveia, trigo, cenoura e cevada entre outros, tem estimado a K_m para o Ca^{2+} entre 10 a 67 μM . Os “contraportadores” funcionam abafando ou amortecendo grandes mudanças no conteúdo de Ca^{2+} no citosol e mantendo o Ca^{2+} armazenado no vacúolo (Bush, 1995).

2.5.2 - Transportadores de influxo

Os influxos de Ca^{2+} podem ocorrer através de uma bomba ou por um “contraportador” operando no sentido inverso. No entanto, estes parecem operar longe do equilíbrio termodinâmico e provavelmente só cumprem a função de exportar Ca^{2+} ; pelo que, as principais rotas de entrada de Ca^{2+} parecem ser os canais.

Os canais de Ca^{2+} podem ser classificados de acordo com a sua localização intracelular: os da membrana plasmática, que são canais de influxo (Fig. 2.3; 3 e 4) e os encontrados noutras membranas intracelulares, que são canais de liberação de Ca^{2+} (Fig. 2.3; 7 e 8).

Uma outra classificação, com cinco classes é baseada na condição que determina o estado do canal em aberto ou fechado. Segundo Bush, (1995) três destas classes de canais tem sido identificados nas plantas:

- canais que funcionam com voltagem,
- canais que funcionam com mensageiros secundários e
- os que funcionam mecanicamente

Descrevemos brevemente cada uma das classes de canais de Ca^{2+} que podem ser encontrados nos vegetais

2.5.2.1 - Canais que funcionam com voltagem.

Os canais de Ca^{2+} da membrana plasmática (Fig. 2.3; 3) e do tonoplasto (Fig. 2.3; 8) já foram identificados, mas não ainda os do retículo endoplasmático (RE), Johannes et al., 1991 citados por Bethke (1995).

Os canais de cálcio da membrana plasmática e do tonoplasto utilizam os gradientes electroquímicos que favorecem o influxo passivo de Ca^{2+} para o interior do citoplasma de todas as células.

A identificação dos canais de Ca^{2+} ao nível da membrana plasmática, tem sido feita com base a sua sensibilidade aos bloqueadores de Ca^{2+} , no entanto medições eléctricas directas, são ainda muito escassas.

Em contraste com estes canais de influxo, existiriam dois tipos de canais (altamente selectivos) de voltagem no tonoplasto, que liberam Ca^{2+} do vacúolo para o citoplasma. Contudo estes dois tipos de canais que são regulados por voltagens, estariam no entanto abertos a diferentes potenciais de membrana (Bush, 1995).

O primeiro grupo encontrado em vacúolos de beterraba sacarina permaneceria aberto em presença de altos potenciais negativos no vacúolo. Estes canais são bloqueados pelo verapamil e pelo La^{3+} e possuem uma condutância de 40 pS (em 100mM Ba^{2+}).

No segundo grupo, também observado no tonoplasto de beterraba sacarina, encontram-se canais de voltagens que permanecem abertos a potenciais que são positivos dentro do vacúolo, apresentando uma condutância de 12 pS (em 5-20 mM CaCl_2).

2.5.2.2 - Canais operados por mensageiros secundários

Um dos mecanismos melhor conhecido para a liberação de Ca^{2+} dos armazenamentos internos é a activação de canais operados pelo Inositol Tri Fosfato (IP_3). O IP_3 foi identificado primeiramente em vesículas isoladas de aveia; posteriormente observou-se que o mesmo induzia a liberação de Ca^{2+} de vacúolos isolados e de outros organelos celulares não identificados em células intactas.

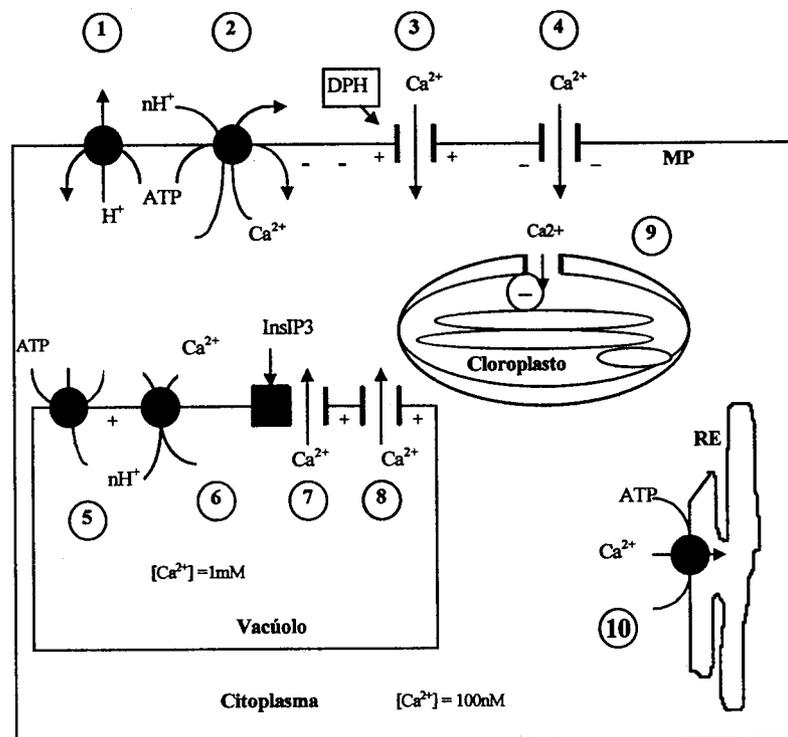


Figura 2.3 - Identidade e localização dos sistemas de transporte envolvidos na homeostasia do Ca^{2+} no citosol. Fonte: Johannes et al., 1991 citados por Bethke et al., 1995.

Na membrana plasmática: 1- H^+ ATPase electrogénica que gera um alto potencial negativo na membrana (tipicamente -150mV), 2- Principal Ca^{2+} ATPase que actua energeticamente na exportação do Ca^{2+} citosólico em troca de H^+ extra-celulares, 3- Canal de Hidroxipiridina (DHP) sensível ao Ca^{2+} , activado por voltagens depolarizantes (+), 4- Outras classes de canais permeáveis ao Ca^{2+} .

O sistema de transporte no Tonoplasto: 5- principal H^+ ATPase electrogénica que gera um potencial positivo na membrana (entre $+20$ e $+50\text{mV}$) e um gradiente interno de pH ácido de 2 unidades, 6- Intercambiador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ accionado pelos componentes químicos e eléctricos das forças motrizes do protão, 7- Canal de Ca^{2+} IP_3 , 8- Canal de Ca^{2+} operado por voltagens, aberto por substituições nos potenciais eléctricos do TP (+).

Transportadores de cálcio noutras membranas: 9- Canal de Ca^{2+} nos cloroplastos que facilita a passagem do Ca^{2+} para o interior do mesmo em resposta a um potencial interno negativo da membrana. 10- Principal Ca^{2+} ATPase no retículo endoplasmático.

O IP₃ vegetal é inibido pela heparina (como o das células de mamíferos). Estes canais possuem uma condutância simples de 30 pS em 5 mM Ca²⁺ (do lado vacuolar), são activos só em condição de potenciais positivos de membrana, e não são especificamente bloqueados pelo verapamil ou o TMB-8 (Bush, 1995).

2.5.2.3 - Canais operados por mecanismos de tensão

(Stretch-operated channel).

Canais de Ca²⁺ activados por mecanismos de tensão foram recentemente identificados na membrana plasmática de várias plantas (Cosgrove, 1991; Ding e Pickard, 1993 citados por Bush, 1995).

Estes canais estariam envolvidos na regulação da turgescência, nas respostas tigmotrópicas (respostas a estímulos mecânicos), na toxicidade pelo Al³⁺, nas respostas a variações de temperatura e hormonas (Bush, 1995).

A selectividade destes canais não é só pelo Ca²⁺, sendo também permeáveis ao K⁺, (Bush, 1995).

Evidências experimentais sugerem que os canais de cálcio da membrana plasmática e do tonoplasto são usados para aumentar a concentração de Ca²⁺ intracelular. Assim, se tem verificado que câmbios na concentração externa de Ca²⁺ produz câmbios muito rápidos na concentração interna de cálcio [Ca²⁺]_i.

Altas concentrações de Ca²⁺ são necessárias para que a planta responda à presença de ácido absícico (ABA), auxinas, citoquininas e giberelinas. Por outro lado um incremento na [Ca²⁺]_i está associado a estas hormonas.

São indirectas as evidências de que os canais da membrana plasmática tem um papel no influxo de Ca²⁺ dentro da célula, no entanto, a demonstração de correntes internas de Ca²⁺ associadas com uma elevada quantidade do mesmo no citosol, implicam os canais de Ca²⁺ como caminhos para a entrada e regulação da [Ca²⁺]_i (Bethke et al., 1995).

2.6 - O Ca^{2+} como mensageiro secundário. (Agente de sinalização)

Devido à incapacidade de se movimentarem, as plantas tem desenvolvido mecanismos para captar e responder a diversos sinais, entre eles aos sinais de *stress*. Isto permite-lhes adaptar-se ou desenvolverem resistência às variações ambientais.

Se bem o Ca^{2+} não é o único responsável pela captação e pelas respostas celulares aos sinais exteriores, qualquer estímulo que induza uma resposta celular complexa, provavelmente envolverá o Ca^{2+} em algum ponto do caminho da “transdução”, o contrario é ainda mais provável.

Nas células animais, mensageiros como os nucleótidos cíclicos e o Ca^{2+} tem um papel vital na transferência de sinais. Nestas células, conhece-se há muito tempo a função do iões cálcio como molécula chave de sinalização.

Nas plantas, o Ca^{2+} tem sido igualmente relacionado com a regulação de vários processos fisiológicos que ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento. Estudos recentes indicam que este ião tem um papel importante como mensageiro na transdução de vários sinais tanto hormonais como ambientais (Tester, 1990; Rincon e Hanson, 1986; Thuleau et al., 1996).

A função do cálcio como mensageiro secundário baseia-se, como anteriormente referido, na baixa concentração de Ca^{2+} livre no citosol e na alta concentração encontrada nos outros constituintes celulares (Trewavas e Gilroy, 1991 citados por Marchner 1995).

O estabelecimento do papel do Ca^{2+} nos caminhos da “transdução” de sinais, requer informação sobre como o estímulo regula os níveis de Ca^{2+} e que proteínas alvo são activadas pelos câmbios na concentração de Ca^{2+} intracelular (Bush, 1995).

Um complexo sistema de circuitos ligam as respostas das células aos estímulos externos. Nas plantas, as hormonas e estímulos ambientais são “transduzidos” em respostas celulares por um conjunto de reacções que só agora começam a ser compreendidas. Os compostos que actuam como mensageiros secundários (entre eles o ião cálcio), desempenham um papel fundamental nos passos da “transdução” que precedem estes estímulos.

As moléculas sinalizadoras formam um complexo tecido de caminhos interconectados, como pode ver-se na Figura 2.4. As interacções entre as cadeias de “sinal-transdução”, as chamadas *cross-talk*, podem ser uma fonte da amplificação do sinal, assim como da complexidade do sinal. Depois do sinal hormonal interactuar com o receptor pode ser “transduzido” dentro da célula via um dos caminhos alternativos; a resposta da célula é independente do caminho ou combinação de caminhos utilizados (Bethke et al., 1995)

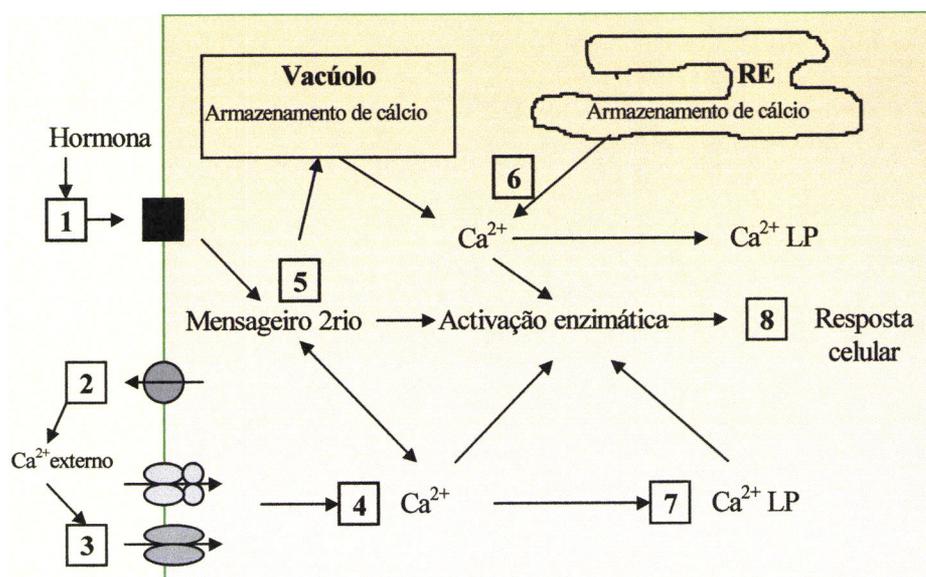


Figura 2.4 – Elementos da homeostase e transporte que ligam os sinais hormonais às respostas celulares numa célula vegetal. Fonte: Bethke et al., (1995).

As fitohormonas (1) são distinguidas pelo receptor possivelmente na superfície externa da membrana plasmática. A percepção da hormona pode mudar a actividade das Ca^{2+} ATPases da membrana plasmática (2), ou dos canais de cálcio da MP e outros transportadores (3), dando como resultado alterações, usualmente um aumento da concentração do cálcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (4). Alternativamente, a hormona pode causar uma segunda mensagem (5), diferente da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como as IP_3 para libertar Ca^{2+} desde os armazenamentos intracelulares (6). São prováveis *cross-talk* entre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e outros mensageiros secundários. O incremento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activa o Ca^{2+} ligado as proteínas Ca^{2+} LP (7), estas proteínas activam enzimas as quais começam a cadeia de eventos que conduzem a uma específica resposta celular (8).

Nem todas as células possuem todos os elementos dos diferentes caminhos de sinalização. Assim, a resposta às hormonas de células diferenciadas, pode ser determinada pela presença de moléculas em tecidos ou tipos de células que contenham estas moléculas de “sinal-transducção” (Bethke et al., 1995).

Os iões de Ca^{2+} possuem um papel proeminente na “transducção” de sinais nas células eucarióticas e têm sido implicados em quase todas as respostas celulares as hormonas, com a excepção do etileno.

O Ca^{2+} é idealmente adequado para cumprir o papel de mensageiro secundário, as suas propriedades físico-químicas permite-lhe interacções altamente específicas entre ele e outras moléculas. A sua baixa concentração citoplasmática pode ser rapidamente alterada, sendo portanto singularmente apropriado para ser uma molécula de sinalização, não é, no entanto, adequado como molécula efectora.

Assim, os câmbios na concentração citoplasmática deste ião, são só uma parte da resposta celular aos sinais hormonais ou ambientais. Para que se produzam as respostas fisiológicas que seguem às modificações na concentração do cálcio citosólico $[\text{Ca}^{2+}]_i$; são necessárias moléculas efectoras. Estas moléculas efectoras são frequentemente proteínas, as quais uma vez ligadas a um ou mais iões de cálcio, modificam a sua conformação tornando-se activadas (Bethke et al., 1995)

É por meio das moléculas efectoras que os sinais baseados no Ca^{2+} são propagados e conseqüentemente os sinais baseados nas modificações da concentração de Ca^{2+} interno, criam especificidade na resposta (Bethke et al., 1995).

O principal alvo dos sinais de Ca^{2+} no citosol, são:

-as *proteínas ligadas* ao Ca^{2+} , conhecidas como proteínas cálcio-moduladas; a mais conhecida é a calmodulina (CaM) e

-as *proteínas dependentes* do Ca^{2+} , mas independentes da calmodulina, como as quinases-proteicas (Roberts e Harmon, 1992). As quinases proteicas são directamente estimuladas pelo Ca^{2+} . Estas enzimas por sua vez fosforilam outras enzimas.

2.6.1 - Proteínas ligadas ao Ca^{2+} : A calmodulina

O Ca^{2+} está ligado com uma alta selectividade mas reversivelmente à CaM, um pequeno polipéptido com quatro pontos de ligação para o Ca^{2+} (Figura 2.5).

Uma vez que a calmodulina é activada pela sua união com o Ca^{2+} , ela própria liga-se a numerosas outras proteínas produzindo a activação das mesmas. A actividade da própria CaM pode ser regulada pelo menos a três níveis:

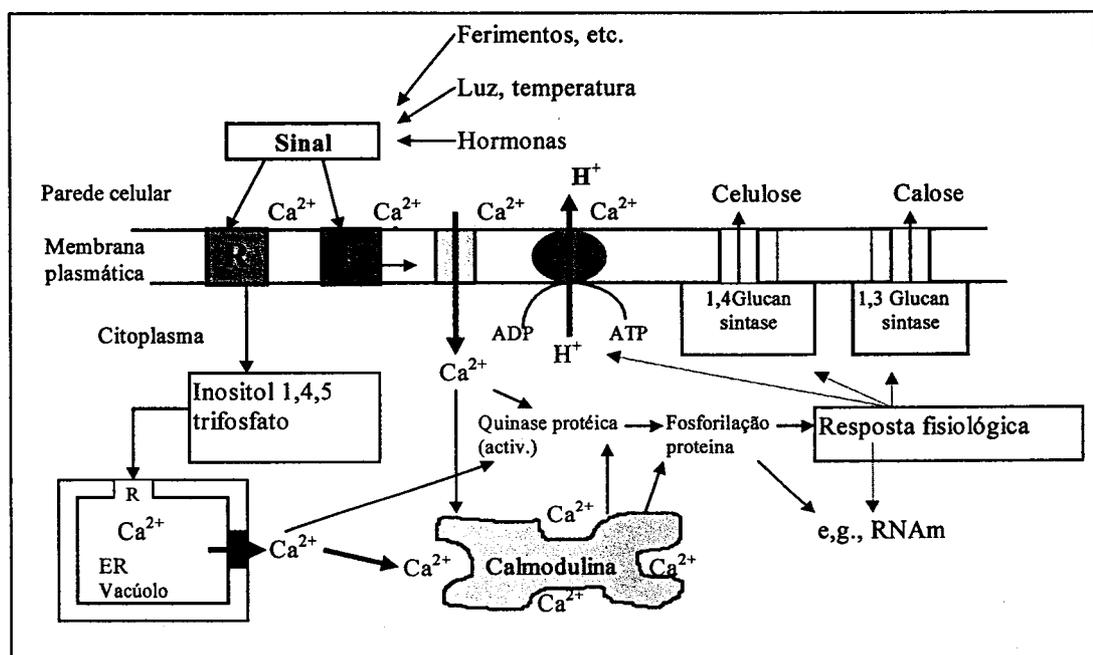


Figura 2.5- Modelo do papel do cálcio como mensageiro secundário na transdução de sinais em células vegetais. R: sítios de recepção de sinais externos; por ex: ABA; IAA. Fonte: Marschner, (1995).

-o primeiro é ao nível da concentração de Ca^{2+} . Quando existem baixas concentrações de Ca^{2+} intracelular (100nM), a CaM existe largamente na sua forma inactivada (forma livre sem Ca^{2+}). Só após a concentração de Ca^{2+} intracelular ser aumentada apreciavelmente é que ocorre a ligação da CaM ao Ca^{2+} .

-a actividade da CaM pode ser também regulada pelo nível da concentração de proteína. Contudo, pouco se sabe sobre a dinâmica da concentração da CaM nas plantas. O nível de CaM em protoplastos de aleurona de cevada é incrementado em 50% ou mais após à sua estimulação por GA_3 (Gilroy e Jones, 1993 citados por

Bethke, 1995); também em *Arabidopsis thaliana*, após dez minutos de estimulação por tato os níveis de CaM são aumentados mais de 10 vezes.

-finalmente a actividade intracelular da CaM se tem visto associada ao aparelho mitótico em células endospermicas (Vantard et al., 1985 citados por Bethke et al., 1995).

Um número relativamente grande de enzimas dependentes da CaM incluindo a NADquinase, que catalisa a conversão de NAD^+ em NADP (aceitador terminal de electrões nos cloroplastos), as NTPases, as Ca^{2+} ATPases do retículo endoplasmático e da membrana plasmática que translocam Ca^{2+} , são também estimuladas pela CaM. A calmodulina de células animais e vegetais são similares em 90% ao nível dos aminoácidos.

2.6.2 - Proteínas dependentes do Ca^{2+} mas independentes da calmodulina

As quinases proteicas são directamente estimuladas pelo Ca^{2+} e estas enzimas por sua vez fosforilam outras enzimas. Uma destas enzimas, localizada na MP e fosforilada pela acção de uma quinase-proteica é a ATPase das bombas de H^+ .

Outras proteínas ligadas ao Ca^{2+} e que são importantes na sinalização incluem: os transportadores iónicos e os elementos do citoesqueleto. Como exemplo pode-se citar a necessidade da presença de Ca^{2+} para a abertura dos canais de fluxo de K^+ e o fecho dos canais de influxo de K^+ na membrana plasmática das células guardas dos estomas, presumivelmente isto ocorre pela interacção directa entre os Ca^{2+} e o canal (Bethke et al., 1995).

2.6.3 - Câmbios no Ca^{2+} citosólico em resposta à sinais de stress

Um elevado número de sinais, incluindo os sinais de stress, provocam o incremento dos níveis de Ca^{2+} no citosol, activando os canais de Ca^{2+} nas membranas e por conseguinte incrementando o influxo de Ca^{2+} . Deste modo, a

concentração de Ca^{2+} livre no citosol é temporariamente incrementada. (Bethke et al., 1995).

Este incremento do Ca^{2+} livre no citosol pode ser induzido por vários factores, alguns dos quais são sumariados nas Tabelas 2.10 e 2.11. Alguns destes sinais ambientais, por exemplo uma brusca descida da temperatura, induzem uma despolarização da membrana plasmática (diferença de potencial com uma variação entre -120 a -180mV), pelo que activam os canais de Ca^{2+} na membrana plasmática (Davies, 1987).

Os factores de *stress* abióticos são rapidamente sinalizados elevando o Ca^{2+} livre no citosol, por ex: o tratamento de protoplastos de milho com cloreto de cálcio elevam o Ca^{2+} no citosol de 1,1 μM para 1,8 μM (Felle, 1991 citado por Bethke, 1995).

Usando plantas transgênicas Knight et al., 1991, citado por Bethke, 1995), mostraram que sinais como o frio, o contacto e o vento influenciam o crescimento vegetal e o seu desenvolvimento, elevando marcadamente os níveis de Ca^{2+} no citosol, especialmente em cotilédones e raízes de plântulas, mas não nos hipocótilos que são relativamente insensíveis ao choque frio.

Tabela 2.10 - Estímulos que produzem câmbios na concentração citosólica de Ca^{2+} nas células vegetais.

ESTÍMULO	TIPO DE CÉLULA	RESPOSTA FISIOLÓGICA (1)	CAMBIO NA $[\text{Ca}^{2+}]$
HORMONAIAS			
Ácido abscísico	Coleoptilo e raiz de milho	Crescimento ?	IT
Auxinas	Células epidérmicas de milho	Crescimento ?	OSC
Citoquininas	Células de <i>Funaria</i>	Iniciação de rebentos	IS
Ác. giberélico	Células de aleurona	Estimulação da secreção	IS
NÃO HORMONAIAS			
Choque frio	Plântulas de tabaco	Aclimação ao frio	IT
Gravidade	Coleoptile de milho	Gravitropismo negativo	IS
Luz	Coleoptile de milho	Fototropismo positivo	IS
Salinidade	Protoplasto de raiz de milho	Tolerância as sais ?	I
Contacto	Plântulas de tabaco	Mecanopercepção	IT
Vento	Plântulas de tabaco	Mecanopercepção	IT

(1) Resposta fisiológica que seria regulada por câmbios no $[\text{Ca}^{2+}]_i$; I, aumento; OSC, oscilação; IS, incremento sustentado; IT, incremento transitório. Fonte: Bethke et al. (1995).

Tabela 2.11 - Sinais ambientais, hormonais e de *stress* que produzem câmbios nos níveis de Ca^{2+} no citosol das células dos vegetais superiores.

SINAL	TÉCNICA DE MEDIÇÃO DO CÁLCIO CITOPLASMÁTICO	EFEITO SOBRE O Ca^{2+} DO CITOSOL
Frio	Aequorin	↑
Stress por sais	Cálcio ligado à corante fluorescente	↑
Vento	Aequorin	↑
Gravidade	Cálcio ligado à corante fluorescente	↑
Luz	Cálcio ligado à corante fluorescente	↑
Contacto	Aequorin	↑
Ac. Abscísico	Cálcio ligado à corante fluorescente	↑
Auxinas	Cálcio ligado à corante fluorescente	↓↑
Ac. Giberélico	Cálcio ligado à corante fluorescente	↑

↓ diminuição no cálcio citosólico, ↑ incremento no cálcio citosólico. Fonte: Reddy, 1995.

Os níveis de etileno e ácido abscísico (ABA) modificam-se em função do *stress* causado à planta por diversos factores. Mediante o emprego da técnica de ligação do Ca^{2+} à corantes fluorescentes demonstrou-se que tanto o ABA, o ácido giberélico e as auxinas incrementam o Ca^{2+} no citosol (Ghring et al., 1990; Gilroy et al., 1993; Jones e Bush, 1991 citados por Bethke et al., 1995).

Os diversos sinais usam diferentes fontes de armazenamento de Ca^{2+} para elevarem os níveis de Ca^{2+} , por ex.: o aumento de Ca^{2+} produzido pelo frio é inibido por bloqueadores da membrana plasmática, mas não é inibido pelos bloqueadores dos canais de cálcio ao nível dos organelos. Todavia, o efeito produzido pelo vento no incremento interno do Ca^{2+} não é bloqueado pelos bloqueadores que afectam os canais dos organelos.

Não existem dúvidas que o *stress* e os sinais hormonais produzem um incremento transitório do Ca^{2+} no citosol. Os mecanismos pelos quais este incremento afecta processos bioquímicos e eventualmente processos fisiológicos mostra-se na Figura 2.6.

Enquanto muitos sistemas de sinalização nos vegetais usam a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como mensageiro secundário, outros mensageiros secundários e sinais (reflectindo o *status* metabólico da célula), são também usados. A título de exemplo são listados na Tabela 2.12, outros mensageiros secundários vegetais.

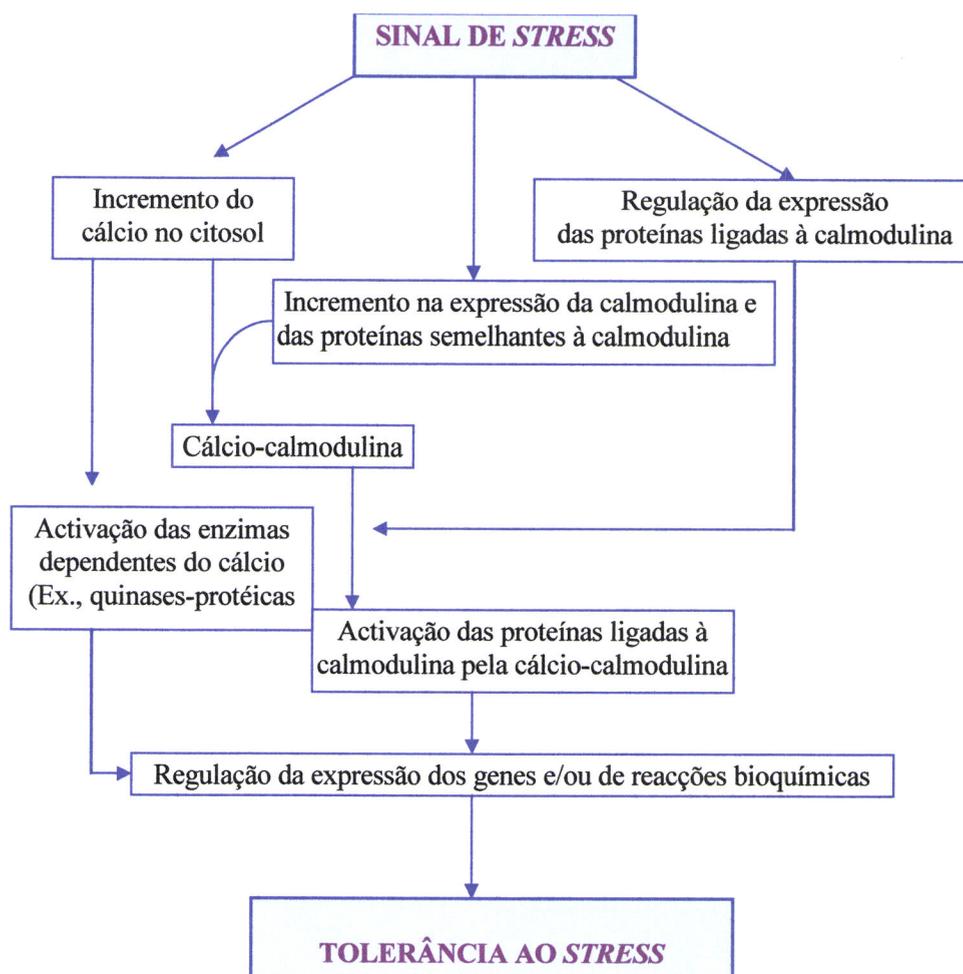


Figura 2.6 - Ilustração dos eventos propostos que envolvem cálcio, calmodulina e calmodulina ligada a proteínas, nos processos de tolerância/resistência ao *stress*. Este modelo baseia-se nos seguintes estudos: Poovaiah e Reddy, 1993; Knight et al., 1991; Lynch et al., 1989; Knight et al., 1993; Braam e Davis, 1990; citados por Reddy, 1995.

Tabela 2.12 - Outros mensageiros secundários nas plantas.

Mensageiro secundário	Actividade
Inositol Fosfatos	Libertam Ca^{2+} dos armazenamentos internos
pH citoplasmático[H^+]	Não conhecida
G-proteínas	Regulação de canais iónicos Regulação do ciclo celular Transporte vesicular
Diacilgliceróis	Activação das bombas iónicas
cAMP	Não conhecida
cGMP	Não conhecida

Fonte: Bethke et al., 1995.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material vegetal

Em todas as experiências realizadas foram usadas sementes comerciais de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) para indústria. As cultivares seleccionadas foram dois híbridos da Petoseed: o Zenith (híbrido com dupla finalidade: para a preparação de concentrado para sumo e frutos inteiros para pelado) e o Hypeel 229 (híbrido exclusivamente destinado a obtenção de frutos inteiros para pelado). As sementes quando recebidas foram armazenadas na sua própria embalagem e no frigorífico até a sua utilização. Para cada experiência realizada foram seleccionadas sementes da mesma época de colheita (por exemplo: Hypeel, Junho 93/Zenith Junho 93).

3.2 - Selecção do material vegetal

Para a selecção destes dois híbridos teve-se em consideração a susceptibilidade dos mesmos à podridão apical (*blossom end rot*). A informação sobre o comportamento varietal em relação a este factor, obteve-se do ensaio realizado por Cardoso Ribeiro no ano 1991, que teve como objectivo a comparação das características de 18 variedades de tomateiro para indústria em diferentes condições de fertilização, destinados à colheita manual e/ou mecânica.

As Tabelas 3.1 e 3.2 incluem os resultados dos frutos rejeitados por podridão apical, para as diferentes variedades de colheita manual e mecânica.

O Hypeel 229 e o Zenith foram ensaiados tanto para colheita mecânica como manual o que permitiu dispor de um maior número de dados comparativamente com as outras variedades ensaiadas. Dos frutos colhidos nas duas apanhas manuais o Zenith apresentou mais de 25 % de frutos com podridão apical na primeira colheita e mais de 22% na segunda, ultrapassando os 15% na colheita única ou mecânica.

Tabela 3.1-Percentagem de frutos com podridão apical rejeitados por variedade em cada uma das colheitas manuais.

	H7151	Petopride	Zenith	H-30	FM785	Mader	Hypeel 229	Hypeel 224
1ra colh.	8,75	2,72	25,05	3,43	2,5	16,97	2,58	28,88
2da colh.	1,24	0	22,25	1,65	14,87	1,01	0,9	9,50

Fonte: Cardoso Ribeiro, F.J. 1992

Tabela 3.2-Percentagem de frutos com podridão apical rejeitados por variedade na colheita mecânica.

	H7151	Red Setter	Can. Row	E6203	Petopr ide	Zenith	FM 922	UC 82B	Hypeel 229	Yuba
Colh. Mec.	1,5	10,7	7,6	12,30	0,9	16,3	6,6	1,7	2,3	3,6

Fonte: Cardoso Ribeiro, F.J. 1992

Pelo contrário e de acordo com os dados de todas as colheitas efectuadas o Hypeel 229 nunca ultrapassou os 3% de frutos com esta deficiência (Cardoso Ribeiro, 1992). Foram assim considerados o Zenith e o Hypeel dois híbridos com diferente susceptibilidade ao cálcio, na época de maturação dos frutos. Não foram encontrados dados quantitativos dos conteúdos relativos de cálcio por grama de matéria seca dos frutos, nem de qualquer outro tecido (caules, folhas, raízes, etc.) das mesmas variedades.

3.3 - Desinfecção superficial das sementes e esterilização dos utensílios

Nas embalagens das sementes comerciais utilizadas referia-se que as mesmas tinham sido submetidas a um tratamento com Thiram (antimicótico) antes do empacotamento; pelo que a esterilização a que foram submetidas neste trabalho tinha

como objectivo principal a eliminação de possíveis bactérias existentes na superfície das mesmas.

A esterilização das sementes foi feita para todas as experiências de acordo com o seguinte procedimento: esterilização superficial por imersão em lixívia comercial Domestos 3, (contendo 5% de cloro activo) diluída 10 vezes (0,5% de cloro na solução final). As sementes permaneceram na lixívia durante 20 minutos, em agitação contínua durante o período da desinfecção. Seguidamente foram transferidas para o fluxo laminar e lavadas (no mesmo recipiente onde foram esterilizadas) com água estéril nunca menos de três vezes.

As lixívias comerciais contêm além do hipoclorito de sódio um detergente redutor da tensão superficial, favorecendo assim, a eficácia de acção daquele. Por outro lado, é importante utilizar embalagens de lixívia ainda intactas, pois, estas uma vez abertas perdem progressivamente o cloro activo tornando o produto menos eficaz.

Todo o material de vidro e utensílios de manuseamento das sementes foi esterilizado em estufa a 180° durante hora e meia.

3 . 4 - Meios de Cultura

A composição geral dos meios de cultura é a seguinte: sais inorgânicos de macro e micronutrientes, vitaminas e carboidratos. Todos estes dissolvidos em água (destilada ou bidestilada) formando uma solução aquosa, a que podem ser adicionados outros compostos como reguladores do crescimento, aminoácidos, e outros agentes não definidos como por exemplo: extracto de levedura, sumos e extractos de frutos, caseína hidrolisada, antioxidantes, etc., segundo a natureza, objectivos da cultura e espécie utilizada.

Geralmente os meios são solidificados com ágar para constituir um sistema de “suporte”. A quantidade de ágar adicionado ao meio permite obter meios sólidos ou

semi-sólidos. Nalguns tipos de trabalhos *in vitro* os meios líquidos (sem adição de agentes solidificantes) ou de dupla fase (sólido, líquido) são mais adequados.

O meio de cultura mais apto para a cultura *in vitro* do tomateiro foi seleccionado num trabalho prévio, realizado no laboratório de Ecotecnologia da Universidade de Paris Sud XI, França (dados não apresentados).

De entre os meios testados (Gamborg ,1966; Gamborg B5, 1968; Heller, 1955; e Murashige e Skoog, 1962) o que apresentou melhores resultados foi o meio de Murashige e Skoog (1962) para macro e micro nutrientes, pelo que foi seleccionado como meio de base para todos os ensaios posteriormente realizados.

3 . 4 . 1- Preparação das soluções mãe e dos meios de cultura

A composição do meio de base utilizado foi a seguinte: sais minerais de macro e micronutrientes de Murashige e Skoog (1962), as vitaminas de Morel (1950), FeEDTA, sacarose e agar. Em nenhuma das experiências realizadas neste trabalho foram adicionados reguladores de crescimento, aminoácidos ou qualquer outro suplemento. Os Anexos I e II, mostram as concentrações das soluções *mãe* e os miligramas de cada composto por litro de meio base preparado.

O meio de base, preparado a partir das soluções mãe, foi modificado em cada experiência de acordo com o objectivo em causa, as alterações a formulação inicial são mencionadas nos materiais e métodos de cada experiência. Estas modificações consistiram geralmente numa redução ou aumento das quantidades de cálcio sob a forma de $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O doseamento de cálcio foi nalguns casos acompanhado por outras modificações do meio de base como por exemplo o conteúdo de sacarose e as fontes de azoto. Todos os meios foram ajustados antes da adição do agar a pH 6.2* com NaOH. O meio com agar foi aquecido em placa de aquecimento magnética, até a obtenção duma solução totalmente transparente, seguidamente efectuo-se a

* Na bibliografia corrente, refere-se que o valor do pH é geralmente ajustado a 5.7-5.8, mas no presente trabalho o Difco Bacto agar quando cozido produzia uma acidificação dos meios para valores de pH inferiores a 5.5 e como resultado não se verificava a gelificação do mesmo. Deste modo, optou-se por aumentar o pH da solução até valores de pH 6.2, sendo o pH final do meio pronto a usar de 5.8.

distribuição do meio nos tubos de ensaio (10 ml/tubo), mediante uma bomba peristáltica.

Os tubos contendo o meio foram esterilizados em autoclave (121°C, 1 atm. de pressão, durante 15 minutos). Os tubos usados foram sempre de 25 x 150 mm com tampa de rosca, distribuídos em suportes de 24 tubos cada.

É importante referir que a qualidade da água é neste trabalho de fundamental importância, porque segundo a natureza da mesma, pode ser uma fonte indesejável de cálcio no meio. Pelo que foi sempre desmineralizada e posteriormente bidestilada, tendo a condutividade eléctrica sido regularmente controlada.

3.5 - Condições físicas da cultura:

As sementes (uma por tubo) foram colocadas no meio em condições de assepsia (no fluxo laminar) e transferidas à sala de cultura. Durante todo o período de crescimento das plantas (15 dias), foram mantidas as seguintes condições: **fotoperíodo:** 16/8 horas (dia/noite); **termoperíodo:** 25/19°C(dia/noite) e uma intensidade luminosa de 2 594 lux +/- 10 lux.

3.6 - Obtenção dos parâmetros biométricos

Os parâmetros biométricos que foram medidos por plântula em todas as experiências realizadas foram os seguintes: comprimento do hipocótilo e da raiz principal, matéria seca da parte aérea e da raiz principal. Para obtenção dos parâmetros biométricos e determinações do conteúdo de cálcio interno, as plântulas de todas as experiências foram retiradas do meio exactamente 15 dias após a colocação da semente em cultura. É de referir que uma plântula de tomateiro com 15 dias de cultura apresenta uma parte aérea composta pelo hipocótilo, os cotilédones e nalguns casos os primórdios foliares pouco desenvolvidos (Figura 3.1).



Figura 3.1. Tamanho de uma plântula de tomate com 15 dias de cultura. A parte aérea é composta pelo hipocótilo, cotilédones e os primórdios foliares pouco desenvolvidos.

3.6.1 - Comprimento

Os valores de comprimento da raiz principal e dos hipocótilos de todas as plântulas por variedade e repetição foram obtidos manualmente (individualmente para cada plântula) mediante o uso de uma régua (Figura 3.2) e os dados anotados numa tabela tipo, como a apresentada no Anexo III.

No caso da parte aérea medimos o comprimento desde o colo da raiz até o ponto de inserção dos cotilédones (ou seja foi medido o hipocótilo).



Figura 3.2. Medição manual do comprimento do hipocótilo.

3.6.2 - Matéria seca

Após a obtenção do comprimento, foram separados raízes e a parte aérea, as raízes de todas as plantas duma mesma repetição foram colocadas numa caixa de Petri (devidamente tarada e identificada), procedendo-se de igual modo com a parte aérea. A matéria seca de raízes e da parte aérea de cada repetição obteve-se por



pesagem em balança de precisão após terem secado por um período de 48 h em estufa a 85°- 90°C (Figura 3.3) e arrefecidos num exsicador.

Figura 3.3 – Caixas de Petri com o material vegetal na estufa de secagem.

Para obter a matéria seca de cada uma das partes da plântula (raiz e parte aérea), o valor da quantidade total de matéria seca (dessa parte) de cada repetição foi dividido pelo número de plântulas analisadas e secas por repetição. Cada repetição tinha um número inicial de 24 plântulas* (1 suporte). Exemplo duma tabela tipo usada para obtenção da matéria seca encontra-se no Anexo IV.

3.7 - Determinações do conteúdo de cálcio nos tecidos.

O conteúdo total de cálcio nos tecidos foi analisado separadamente em raízes e parte aérea, da seguinte forma:

Após a obtenção da matéria seca de cada repetição (raízes e parte aérea separadamente) cada amostra foi macerada manualmente num almofariz de vidro até a obtenção dum pó fino, retirando-se uma amostra que foi geralmente de 50 mg para a parte aérea (® na tabela do Anexo V), e de 25 mg para as raízes. Esta amostra foi submetida durante 48 h à extracção de cálcio em ácido clorídrico 0,1N (50% p/v; ♦ na tabela do anexo V) em agitação e posteriormente filtrado com papel de filtro Whatman nº1.

Da solução de ácido (filtrada) contendo os iões cálcio foram preparadas amostras, diluídas 10 vezes, sendo seguidamente analisadas em espectrofotómetro de absorção atómica (Perkin Elmer mod. 2380, equipado com uma lâmpada de cálcio de cátodo oco). Para a realização das leituras foi usada uma chama oxidante de ar/acetileno, ajustando o comprimento de onda à 422.7 nm e abertura de 0,7.

A solução padrão de cálcio (a 5 ppm), foi preparada a partir de uma solução de cálcio BDH à 1000 ppm. Para realizar os ajustes do espectrofotómetro, o branco usado foi a solução de ácido clorídrico 0,1N preparada para a extracção de cálcio da matéria seca e para a preparação das respectivas diluições.

De cada amostra foram feitas três leituras e com estas se obteve uma média do conteúdo de cálcio relativo a cada repetição (* na tabela do Anexo V). A

* É de referir que as perdas de indivíduos por repetição foram mínimas (< de 1%) e que a maioria destas perdas foram devidas à não germinação das sementes postas em cultura.

concentração de Ca^{2+} nos tecidos é sempre expressa em mg de Ca^{2+} por grama de matéria seca.

3 . 8 - Delineamento experimental e análise dos dados

Os dados de cada experiência foram sujeitos a análise de variância (ANOVA) de factores múltiplos mediante o programa Statgraph Plus versão 7. As regressões e correlações foram feitas no FMSAS (File Management and Statistical Analysis System 2.01 (1987) do Statpack (Biometrical Software Package 2.01). Cada variedade teve 3 repetições por tratamento (3 suportes de 24 tubos cada). O tratamento das médias foi avaliado pelo método das diferenças mínimas significativas (dms) para $p < 0.05$.

4 - EXPERIÊNCIA 1

4.1 – Introdução e objectivo

Segundo Atkinson et al. (1992) existe uma considerável variabilidade inter específica na concentração de cálcio da seiva xilemática de plantas que crescem em locais com concentrações similares de cálcio na rizosfera.

De acordo com Atkinson et al. (1991a, b) os factores determinantes da concentração de cálcio na seiva xilemática que é transferida a parte aérea são; a) características determinadas pelo genótipo e b) a quantidade de cálcio na rizosfera.

Deste modo, esta primeira experiência teve por objectivo detectar diferenças no transporte e distribuição do cálcio e nas respostas das duas variedades seleccionadas pela sua diferente susceptibilidade á podridão apical, em diferentes concentrações de cálcio no meio. A avaliação das respostas genótípicas foi feita pela determinação dos conteúdos de cálcio que foram translocados para a parte aérea e dos conteúdos de cálcio presentes na raiz, em plântulas de 15 dias das duas variedades cultivadas *in vitro* (testes precoce). Avaliou-se também o efeito que as diferentes concentrações de cálcio do meio tiveram sobre os parâmetros biométricos mais importantes, tais como; crescimento da parte aérea e da raiz, matéria seca da parte aérea e da raiz, tamanho das células (comprimento) da parte aérea (hipocótilo) e eficiência de utilização do ião para a produção de matéria seca, pelas duas variedades.

4.2 - Material e Métodos

4.2.1 - Meios de cultura (tratamentos)

Os materiais e métodos utilizados nesta experiência foram idênticos aos descritos no Capítulo 3 (Material e Métodos) com excepção dos valores de cálcio no meio, que variaram para cada tratamento. Os meios de cultura utilizados foram

preparados a partir de uma solução mãe de Murashige e Skoog (1962) sem cálcio. Deste modo, foram constituídos nove tratamentos diferentes segundo a quantidade de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ adicionada (Tabela 4.1). Nenhuma outra alteração foi feita nos tratamentos.

Tabela 4.1 - Quantidades de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em mg l^{-1} adicionados ao meio de base de Murashige e Skoog (1962), e correspondentes valores em mM e meq. de cálcio para cada tratamento.

	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3*	Trat. 4	Trat. 5	Trat. 6	Trat. 7	Trat. 8	Trat. 9
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	660	550	440	374	330	220	154	66	0
mM de Ca^{2+}	4,49	3,74	3,00	2,54	2,24	1,50	1,05	0,45	0
meq. de Ca^{2+}	8,98	7,48	6,00	5,08	4,48	3,00	2,10	0,90	0

*Nível de cálcio no meio de Murashige e Skoog (1962)

Tratamento 9 = sem adição de cálcio.

É importante salientar que as quantidades de cálcio referidas na Tabela 4.1, foram as adicionadas ao meio. No entanto, existem outras fontes de cálcio nos componentes do meio (Tabela 4.2), que pelo facto de serem quantidades muito pequenas em relação aos níveis de cálcio adicionados e sobretudo por serem as mesmas para todos os tratamentos não foram consideradas. Utilizou-se deste modo, o termo mM de cálcio no meio para referir as quantidades adicionadas.

As outras possíveis fontes de cálcio, foram quando possível quantificadas como é caso das quantidades de cálcio nas sementes e na água, bidestilada usada na preparação dos meios. O valor médio da quantidade de cálcio presente no Difco-Bacto agar foi obtido dos dados publicados por Moncousin, (1991).

Os resultados que são apresentados na Tabela 4.2, são valores médios por tubo de ensaio com 10 ml de meio de cultura e valor médio de cálcio numa semente de tomate. Para efeitos de comparação com os valores da Tabela 4.1 também são apresentados os valores por litro de meio.

Tabela 4.2 - Conteúdos médios de cálcio nos componentes de um tubo de ensaio posto em cultura (10 ml) e por litro de meio.

Componente	mg de cálcio/tubo	mg l ⁻¹
Semente	0.0041	
Água	0.0073	0.73
Sacarose	0.01	1
Ágar (Difco-Bacto)*	0.18	18

Fonte: Moncousin, (1991).

Como se pode constatar, o ágar é o factor externo que introduz no meio maiores quantidades de cálcio.

4.2.2 – Tamanho das células. (Comprimento).

Para se efectuar uma comparação do tamanho das células da parte aérea em função do conteúdo de cálcio no meio, foram seleccionados os tratamentos com 0.45 e 4.5 mM de cálcio (0.660 mg e 0.066 mg de CaCl₂.2H₂O por litro de meio).

Foram preparados três suportes com 24 tubos para cada um dos tratamentos e colocados em cultura com a finalidade de os utilizar exclusivamente para as observações microscópicas. Após 15 dias em cultura, as plântulas foram retiradas para observação microscópica.

Uma camada superficial de células do hipocótilo (no sentido do crescimento) foi retirada longitudinalmente, com auxílio duma lâmina, e posteriormente foi observada num microscópio óptico. Um porta-objecto com uma escala graduada de 2 mm, foi usado para calibrar a ocular graduada para cada aumento da objectiva.

Os valores apresentados correspondem à média de três repetições de 75 células para cada variedade e tratamento.

4.2.3 - Densidade celular dos tecidos da parte aérea

Para obtenção da densidade celular da parte aérea, ou seja da quantidade de biomassa por área, considerou-se o hipocótilo das plântulas como sendo um cilindro

de 1mm^2 de diâmetro (valor aproximado para o diâmetro do hipocótilo das plântulas de tomate com 15 dias de cultura). Deste modo o volume do mesmo foi calculado através da seguinte equação: $V = h \cdot \pi \cdot r^2$

Onde: h = comprimento do hipocótilo; $\pi = 3.1416$; r^2 = diâmetro. A densidade foi obtida pela razão entre a matéria seca e o volume da parte aérea.

$$\text{Dens.} = \text{MS}/V$$

4.3 - Resultados

4.3.1 - Conteúdo de cálcio nos tecidos

4.3.1.1 - Parte aérea

Os conteúdos de cálcio nos tecidos da parte aérea variaram em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio de cultura, das variedades e das interações cálcio no meio por variedade (Quadro 1, Anexo VI). A um incremento no conteúdo de cálcio no meio correspondeu um incremento no conteúdo de cálcio nos tecidos da parte aérea das variedades estudadas.

De acordo com a análise estatística, só não houve diferenças significativas entre as médias dos tratamentos que continham 0.45 mM de cálcio e o tratamento sem adição de cálcio, e entre 3.00 e 3.74 mM, para o total dos dados analisados (Figura 4.1).

Como mostra a Figura 4.2 a variedade Hypeel apresentou uma média significativamente superior para o conteúdo médio de cálcio nos tecidos da parte aérea quando comparados com os valores de Zenith.

Na Figura 4.3 apresentam-se os resultados do conteúdo de Ca^{2+} interno para cada variedade em função dos tratamentos. Como pode ver-se, houve nas duas variedades um aumento nas quantidades de cálcio nos tecidos da parte aérea a medida que foi incrementada a quantidade de cálcio no meio de cultura. No entanto, os conteúdos de cálcio nos tecidos de Hypeel e Zenith foram diferentes para a maioria dos meios testados.

A baixas concentrações de cálcio no meio (0.45 mM e não adição de cálcio) a variedade Zenith apresentou valores significativamente mais elevados que Hypeel, inversamente foi observado para altas concentrações (a 3.74 e 4.49 mM de cálcio no meio).

Com concentrações acima de 3 mM de cálcio, Zenith manteve os valores de cálcio dos tecidos da parte aérea dentro de uma gama de valores menos variáveis (entre 17.5 e 19.92 mg de Ca^{2+} por grama de matéria seca).

Contrariamente, Hypeel sobe rapidamente os níveis de Ca^{2+} interno para os tratamentos com quantidades mais elevadas de cálcio, apresentando mais de 25 mg de Ca^{2+} por grama de matéria seca, em meios com 4.49 mM de cálcio.

Também se verifica na Figura 4.3, que Hypeel apresenta uma maior quantidade de cálcio para a maioria das concentrações testadas, todavia para concentrações entre 2.54 e 3.00 e 3.74 mM não se observaram diferenças entre as variedades.

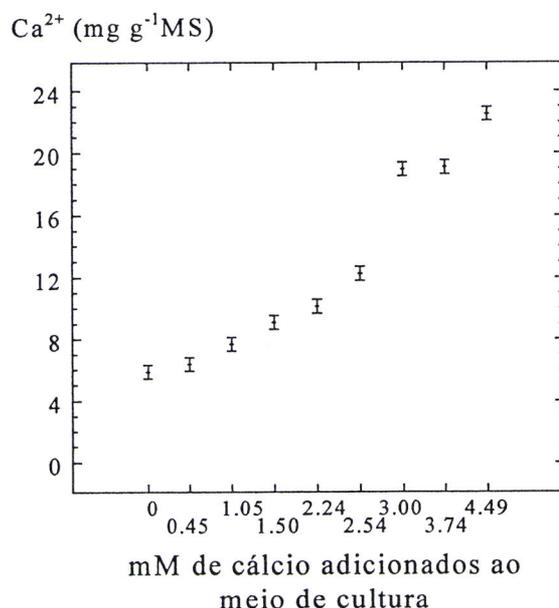


Figura 4.1-Intervalos de confiança (95% dms) para o conteúdo médio de Ca^{2+} (mg g^{-1} MS) das duas variedades; em função da concentração de cálcio adicionado ao meio (mM).

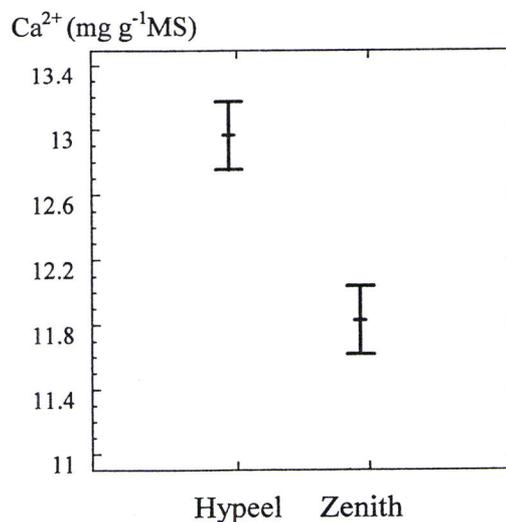


Figura 4.2-Intervalos de confiança (95% dms) para o conteúdo de Ca^{2+} (mg g^{-1} MS) nos tecidos da parte aérea em função das variedades; para o total das concentrações de cálcio testadas.

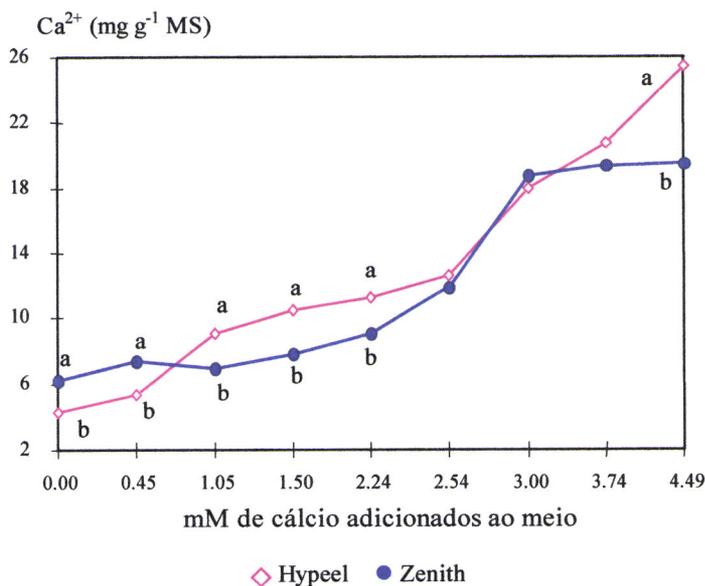


Figura 4.3 - Conteúdo de cálcio (mg g^{-1} MS) para plântulas de 15 dias, de ambas as variedades em função da quantidade de cálcio adicionado ao meio (mM). **a**; **b**, diferenças significativas entre as médias das variedades ($p < 0.05$).

4.1.2 - Conteúdo de cálcio na raiz

A análise de variância realizada para o conteúdo de cálcio na raiz para o total dos dados analisados (Quadro 4 do Anexo VI) mostra que este é influenciado pela concentração externa de cálcio (Fig. 4.4). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre as variedades (Fig. 4.5).

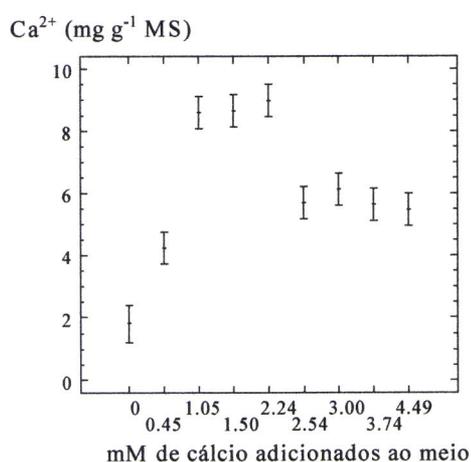


Figura 4.4 -Intervalos de confiança (95% dms) para o conteúdo de cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS) em função do cálcio no meio (mM). Valores para a média das duas variedades.

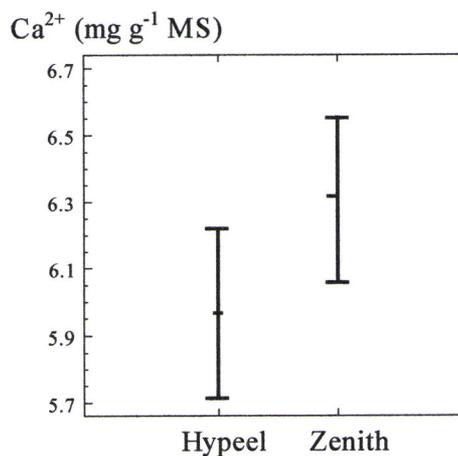


Figura 4.5 -Intervalos de confiança (95% dms) para o conteúdo de cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS) em função das variedades. Média dos valores de todas as concentrações de cálcio para cada variedade.

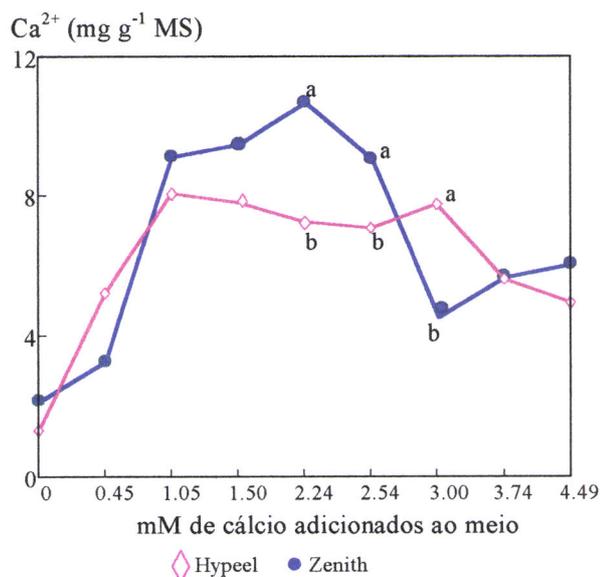


Figura 4.6-Conteúdo de cálcio na raiz (mg g^{-1} MS) em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio de cultura (mM). **a; b** diferenças significativas entre variedades.

A Figura 4.6 mostra que o conteúdo de cálcio nos tecidos da raiz, foi maior em ambas variedades para níveis intermédios de cálcio no meio de cultura, decrescendo para os valores extremos. Este padrão não é semelhante ao apresentado pela parte aérea.

A análise das interações mostrou que existem diferenças significativas entre as variedades para os níveis de cálcio intermédios, sendo os valores observados para a variedade Zenith significativamente superiores para concentrações de 2.24 e 2.54 mM de cálcio no meio. No entanto não houve diferenças para os conteúdos de cálcio entre as raízes de Hypeel e Zenith que cresceram com pouco cálcio no meio, acontecendo o mesmo para os meios com muito cálcio. (Fig. 4.6).

4.3.2 – Distribuição do cálcio absorvido entre os tecidos da parte aérea e da raiz

Devido às diferenças observadas entre as curvas dos conteúdos de cálcio nos tecidos da parte aérea e da raiz em função da concentração externa de cálcio, considera-se importante analisar a distribuição de cálcio entre os tecidos a parte aérea e a raiz.

Nos tratamentos extremos (altas ou baixas concentrações de cálcio no meio) a maior parte do cálcio absorvido pelas variedades foi translocado para a parte aérea, tendo os valores atingido 70 % do cálcio total.

A níveis intermédios de cálcio no meio de cultura a distribuição do cálcio absorvido foi de aproximadamente 50% para cada uma das partes da plântula.

Nas Figuras 4.7a (Hypeel) e 4.7b (Zenith), pode observar-se uma representação gráfica da distribuição do cálcio nos tecidos para cada nível de cálcio no meio de cultura. Para concentrações superiores a 3.00 mM de cálcio externo, não se observou em Zenith incremento na quantidade de cálcio que é translocado para a parte aérea.

Por outro lado as raízes desta variedade apresentaram maior quantidade de cálcio (por grama de matéria seca) que a parte aérea para valores intermédios de cálcio no meio. Este padrão não foi observado em Hypeel cujas raízes tiveram sempre menor quantidade de cálcio que a parte aérea.

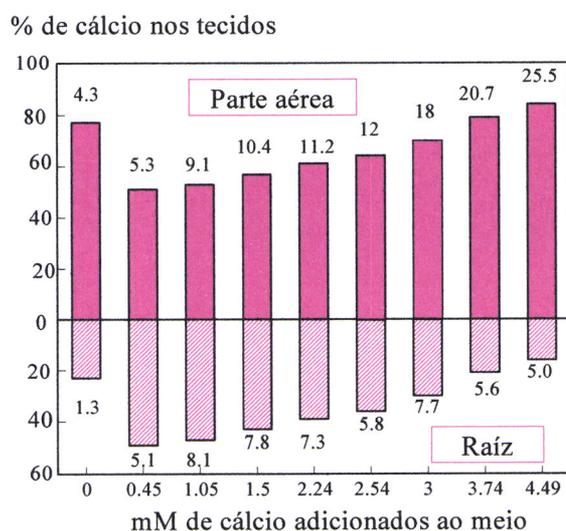


Figura 4.7a

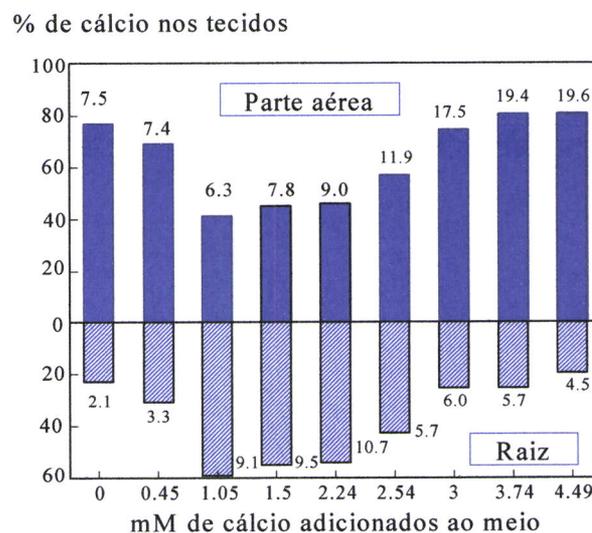


Figura 4.7b

Figura 4.7. Partição do cálcio (em percentagem) entre a parte aérea e a raiz (plântulas de 15 dias) de Hypeel (4.7a) e Zenith (4.7b) para cada nível de cálcio no meio. O comprimento das barras mostra as percentagens do cálcio total para cada órgão e os valores numéricos sobre as barras a quantidade de Ca^{2+} por grama de matéria seca de cada órgão.

4.3.2 - Parâmetros biométricos

4.3.2.1 - Comprimento da parte aérea (hipocótilo)

Os níveis de cálcio no meio influenciaram o comprimento dos hipocótilos das duas variedades como se pode verificar pela análise de variância (Quadro 2 do AnexoVI). As plântulas de ambas as variedades apresentaram um maior crescimento quando as concentrações de cálcio no meio foram baixas (0.45 e 1.05 mM de cálcio), com exceção do meio ao qual não foi adicionado cálcio (Fig. 4.8).

A partir da concentração de 1.50 mM verifica-se um decréscimo dos valores do comprimento do hipocótilo tanto para Hypeel como para Zenith. Tal decréscimo tem o seu valor mínimo para a concentração de 3.00 mM de cálcio no meio.

Nos meios em que foram adicionados mais de 3.00 mM de cálcio pode observar-se um novo aumento do comprimento do hipocótilo para as duas variedades (Fig. 4.8 e 4.10).

A Figura 4.9 mostra que o comprimento da parte aérea da variedade Hypeel foi significativamente inferior comparativamente com Zenith.

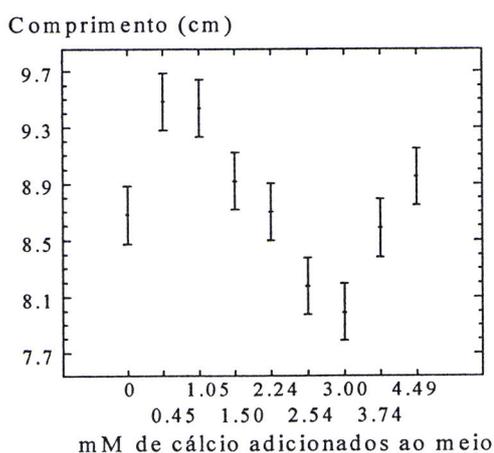


Figura 4.8-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento dos hipocótilos (cm) em função da quantidade de cálcio adicionado ao meio de cultura (mM). Os valores representam as médias para os valores de ambas as variedades.

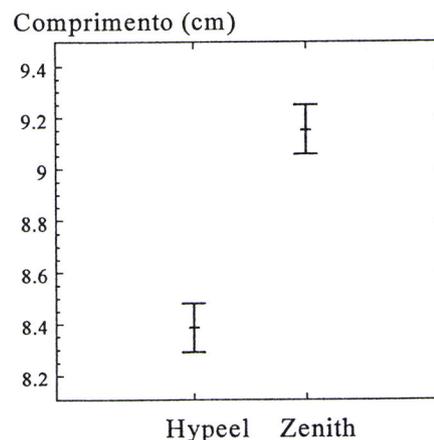


Figura 4.9-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento dos hipocótilos em função das variedades. Valores médios para o total das concentrações testadas.

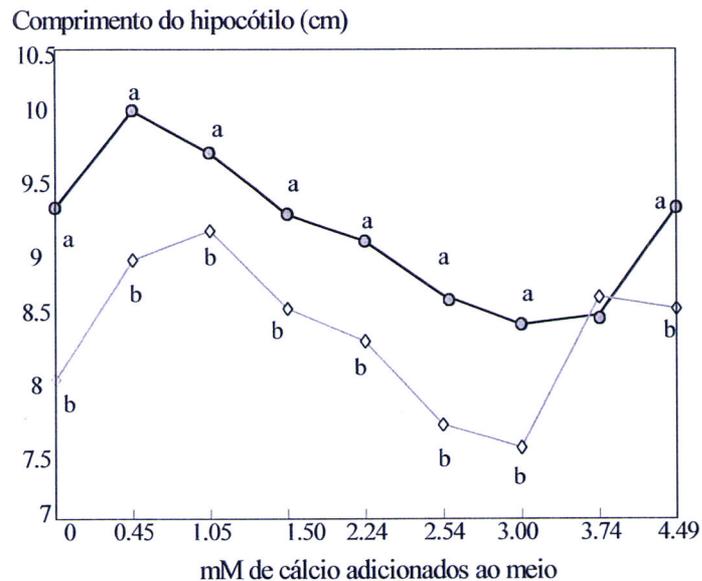


Figura 4.10 - Comprimento do hipocótilo (cm) em função da concentração de cálcio no meio (mM). **a;b** diferenças significativas entre variedades.

A análise de variância efectuada para as interações (cálcio no meio x variedade), mostra que com excepção do meio que continha 3.74 mM de cálcio, a variedade Zenith apresenta hipocótilos significativamente mais compridos que Hypeel, (Fig. 4.10). Também se verifica que, os hipocótilos das duas variedades apresentaram maior crescimento em meios com concentrações de cálcio menores e um decréscimo no comprimento quando o cálcio no meio foi incrementado, como pode verificar-se pela comparação das plântulas da Figura 4.10a.

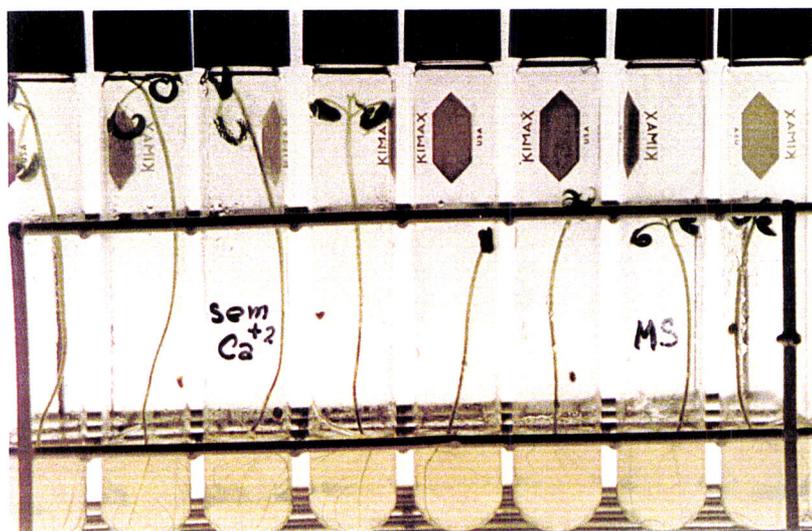


Figura 4.10a. Diferenças no comprimento dos hipocótilos de plântulas de 15 dias de Hypeel, submetidas a diferentes concentrações de cálcio no meio. Meios sem adição de cálcio (Sem Ca^{2+}) e meios MS (com 3.00 mM de cálcio).

No entanto, a partir de 3.00 mM de cálcio no meio, os hipocótilos apresentaram um aumento no comprimento em Zenith sendo significativamente mais compridos para uma concentração de 4.49 mM de cálcio no meio.

4.3.3.2 - Comprimento da raiz

O comprimento da raiz principal foi também afectado pela quantidade de cálcio disponível no meio de cultura, como pode ver-se pelas Figuras 4.11 e 4.12. A análise de variância (Quadro 5; Anexo VI) mostrou diferenças significativas para o comprimento da raiz principal em função da concentração de cálcio no meio e em função das variedades, mas não para o resultado das interacções entre estes factores analisados.

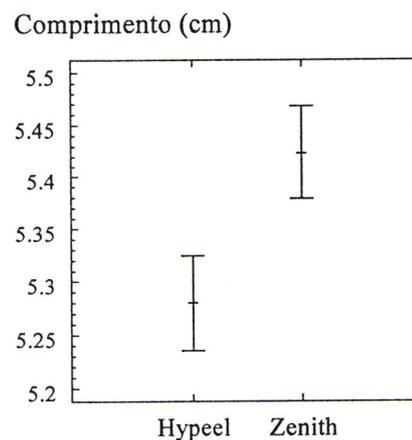
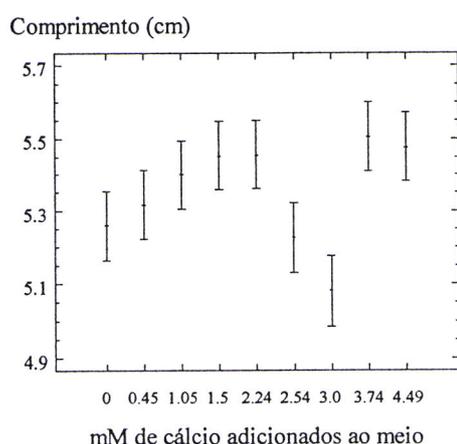


Figura 4.11. Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento da raiz em função da concentração de cálcio no meio (mM). Valores correspondentes à média das duas variedades.

Figura 4.12. Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento das raízes (cm) em função da variedade para o total dos tratamentos.

O comprimento das raízes foi menos variável que o dos hipocótilos em relação as quantidades de cálcio no meio, se bem que, como no caso dos hipocótilos, as raízes que apresentaram um menor crescimento foram as das plântulas que se desenvolveram nas concentrações de 2.54 e 3.00 mM cálcio no meio. Considerando

A partir de uma concentração superior a 2.24 mM de cálcio no meio a variedade Zenith reduz drasticamente a quantidade de matéria seca da parte aérea. Para esta variedade, nos meios com concentrações inferiores a 2.24 mM e sem adição de cálcio, a quantidade de matéria seca da parte aérea não apresenta diferenças significativas entre os seus valores.

4.3.2.4 - Matéria seca da raiz

Na sua generalidade o incremento de cálcio no meio, teve como efeito uma redução na quantidade de matéria seca das raízes das duas variedades (Figura 4.14).

Através da análise de variância (Quadro 6; Anexo VI), foram encontradas diferenças significativas, para a matéria seca da raiz em função da quantidade de cálcio no meio e da variedade (para o total dos dados analisados), como pode observar-se nas Figuras 4.14 e 4.15.

Não houve no entanto, diferenças significativas para o resultado das interações destes dois factores.

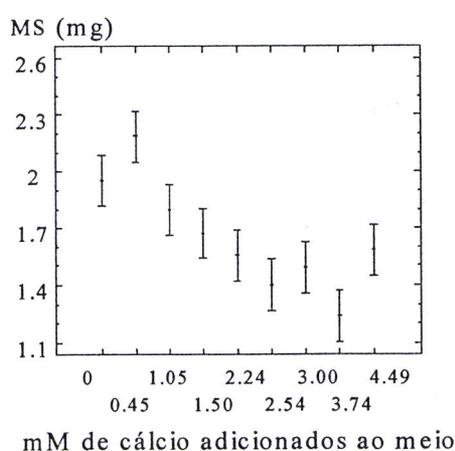


Figura 4.14 - Intervalos de confiança (95% dms) para a quantidade de matéria seca da raiz em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio (mM). Valores médios para ambas as variedades.

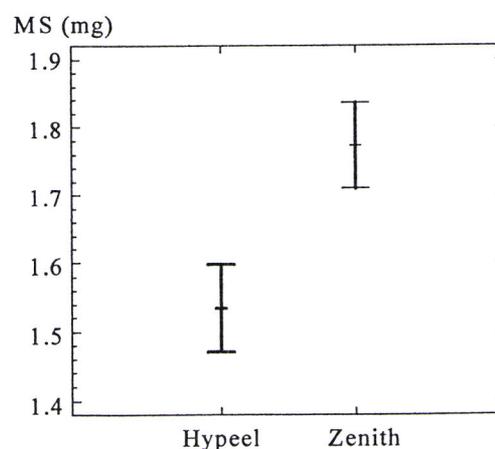


Figura 4.15 - Intervalos de confiança (95% dms) para a quantidade de matéria seca da raiz (mg) em função das variedades. Valores médios para o total dos tratamentos.

4.3.2.5 - Razão: matéria seca da raiz/matéria seca da parte aérea.

Um outro aspecto importante nos estudos de nutrição mineral diz respeito à distribuição da biomassa entre a raiz e a parte aérea. Comparou-se assim a esta razão para suprimentos de cálcio no meio considerados adequados (3.00 mM) e para baixos suprimentos (0.45 mM). Os resultados são apresentados na Tabela.4.2.

Tabela 4.3. Razão matéria seca da raiz/matéria seca da parte aérea, para as duas variedades em função de duas concentrações de cálcio no meio.

	Suprimento de cálcio adequado (3.00 mM)			Suprimento inadequado de cálcio (0.45 mM)		
	Raiz (mg)	Parte aérea (mg)	Razão: raiz/ parte aérea	Raiz (mg)	Parte aérea (mg)	Razão: raiz/ parte aérea
Hypeel	1.367	3.82	0.36	2.123	4.913	0.43
Zenith	1.620	5.13	0.32	2.25	6.32	0.36

Verifica-se que para Hypeel a razão aumenta de 0.36 a 0.43 entre as plantas com adequado suprimento de cálcio e as que cresceram com baixa disponibilidade de cálcio. Esta diferença de valores deve-se fundamentalmente à maior biomassa das raízes da variedade Hypeel nos meios mais pobres em cálcio.

4.3.2.6 - Razão: matéria seca/comprimento (“Densidade celular”)

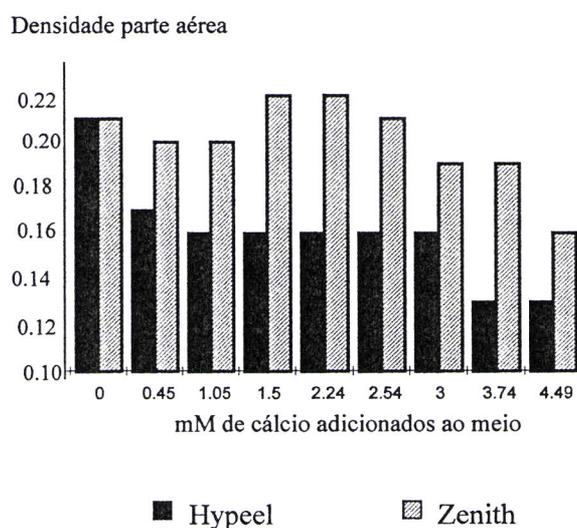
A análise das curvas de crescimento da parte aérea em função da concentração de cálcio no meio, mostra que as plântulas apresentaram um maior crescimento em baixas concentrações de cálcio no meio, este crescimento decresceu a medida que se adicionou mais cálcio no meio. Este comportamento foi também observado para a quantidade de matéria seca na parte aérea para as duas variedades.

Em concentrações superiores a 3.00 mM verificou-se um aumento do comprimento e uma diminuição da quantidade de matéria seca da parte aérea, podendo inferir-se destes resultados que estas plântulas possuíam maior quantidade

de água comparativamente com as que se desenvolveram em baixas concentrações de cálcio. Esta observação foi corroborada quando se calculou a razão entre a quantidade de matéria seca e o volume do hipocótilo. Esta razão foi designada como “densidade celular” e reflecte a quantidade de biomassa da parte aérea (para cada valor de comprimento) em função da concentração de cálcio no meio.

A Figura 4.16 mostra os valores de densidade celular em função da concentração de cálcio no meio para ambas as variedades. Na Figura pode observar-se que Hypeel mantém o mesmo valor de densidade (aproximadamente 0.16) para 1.05, 1.50, 2.24, 2.54 e 3.00 mM de cálcio externo. Tendo esta variedade um valor máximo de densidade quando não adicionamos cálcio no meio e valores mais baixos para os meios com mais de 3.00mM de cálcio.

Zenith, que possui maior produção de biomassa por unidade de volume da parte aérea, apresenta uns valores de densidade mais uniformes em função da



concentração de cálcio no meio, correspondendo os máximos valores de densidade para os meios com quantidades intermédias de cálcio. Tal como foi verificado para Hypeel, também em Zenith o menor valor de densidade correspondeu ao meio com máxima concentração de cálcio.

Figura 4.16-Valores de densidade celular em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio.

É de salientar que o parâmetro “densidade celular” é menos variável que o conteúdo de matéria seca. No entanto, este parâmetro também põe em evidência diferenças substanciais entre as variedades.

4.3.2.7 – Tamanho das células (comprimento)

Para avaliar-se os efeitos da concentração de cálcio sobre o “tamanho” das células da parte aérea (hipocótilos), utilizaram-se dois tratamentos extremos: 0.45 mM e 4.49 mM cálcio no meio (66 e 660 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Nas Figuras 4.17, 4.18 e 4.19 e no Quadro 7 do Anexo VI, apresentam-se os resultados da análise estatística.

A Figura 4.17 mostra que o comprimento médio das células está directamente relacionado com o conteúdo de cálcio no meio, e que a um maior conteúdo de cálcio corresponde um aumento do comprimento.

Na Figura 4.18 pode ver-se que o comprimento médio das células dos hipocótilos de Hypeel foi significativamente superior ao das células de Zenith.

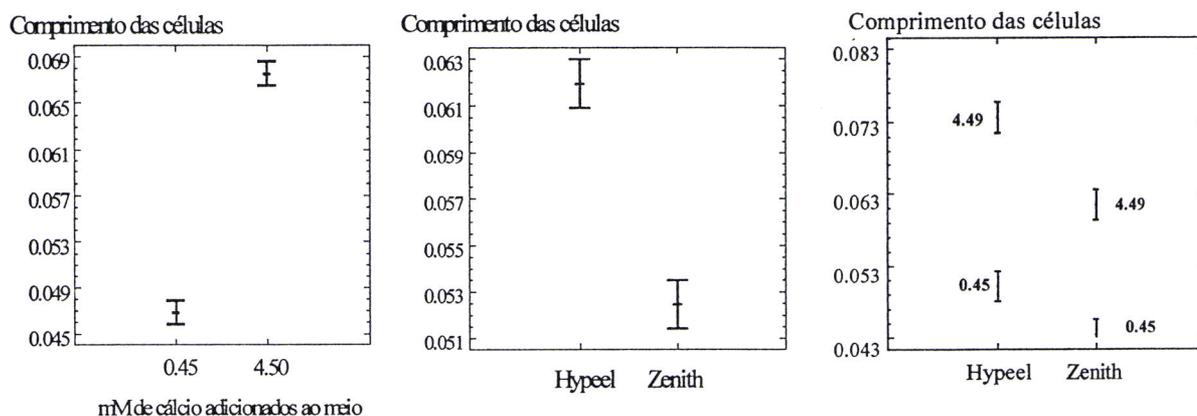


Figura 4.17 - Intervalos de confiança (95%dms) para o comprimento das células (em mm) em função da concentração de cálcio (mM). Média das duas variedades.

Figura 4.18 - Intervalos de confiança (95%dms) para o comprimento das células (em mm) em função da variedade. Média de todas as concentrações de cálcio testadas.

Figura 4.19 - Variação do comprimento médio das células das duas variedades em função da concentração de cálcio (mM).

Esta diferença entre as duas variedades deveu-se principalmente aos maiores comprimentos que apresentaram as células de Hypeel no meio com 4.5 mM de cálcio, como pode ver-se na Figura 4.19.

4.3.3 - Eficiência de utilização do íon cálcio para a produção de matéria seca

As plantas que crescem em condições de baixa disponibilidade de nutrientes normalmente aumentam a sua capacidade de absorção (Cogliatti e Clarkson, 1983; Kochian e Lucas, 1982 citados por Gutschick, 1993) através do aumento da distribuição do sistema radicular e da diminuição do conteúdo dos nutrientes nos tecidos (Davidson, 1969a; Ingestad e Lund, 1979 citados por Gutschick, 1993). O aumento na capacidade de absorção das raízes é composto por uma série de respostas fisiológicas. À medida que diminui a quantidade de um nutriente no tecido incrementa-se a eficiência de utilização do mesmo.

A eficiência de utilização de um nutriente não é um parâmetro fácil de definir, podendo ser expressa como o conteúdo fraccional de um nutriente: $1/f_n$ (conteúdo fraccional do nutriente; expresso em gramas do nutriente por grama de matéria seca), ou ainda como a sua utilização fotossintética (Chapin, 1980). Nalguns casos uma diminuição da f_n pode ser neutral ou mostrar uma falta de adaptação por parte da planta.

A Tabela 4.4 e a Figura 4.20 mostram que a eficiência da utilização do íon cálcio foi maior para Hypeel (0.23, 0.19) comparativamente com Zenith (0.16, 0.15) nos tratamentos que continham as menores concentrações de cálcio (sem adição e 0.45 mM, respectivamente).

Tabela 4.4-Eficiência de utilização do cálcio em função da quantidade de cálcio adicionado ao meio (parte aérea).

Cálcio adicion. ao meio (mM)	$1/F_n$	$1/F_n$
	Hypeel	Zenith
0	0.23	0.16
0.45	0.19	0.15
1.05	0.11	0.14
1.50	0.10	0.13
2.24	0.09	0.11
2.54	0.08	0.08
3.00	0.06	0.05
3.74	0.05	0.05
4.49	0.04	0.05

Em condições de baixa disponibilidade de cálcio no meio (sem adição e 0.45mM) Hypeel é mais eficiente na produção de matéria seca por cada grama de cálcio incorporada que a outra variedade, como pode observar-se na Figura 4.20.

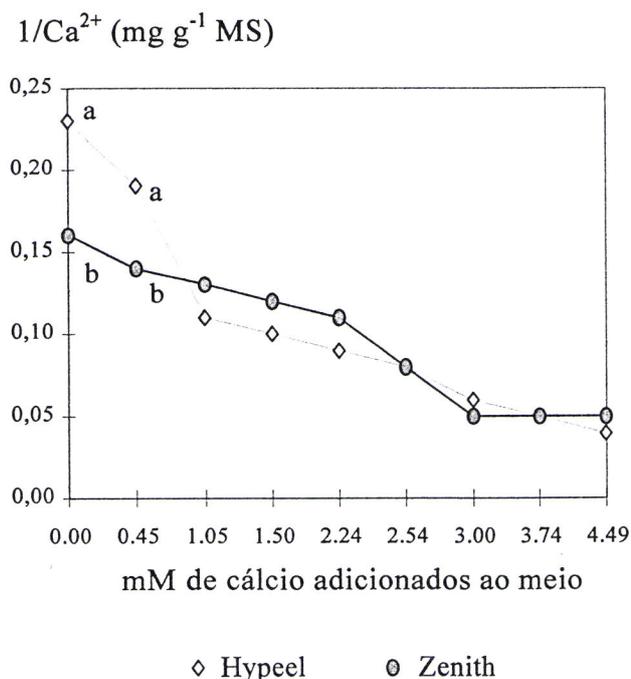


Figura 4.20. Eficiência de utilização do ião cálcio ($1/f_n$) em função da quantidade de cálcio adicionado ao meio.

A diferença entre as variedades diminui a medida que se incrementam as quantidades de cálcio no meio. Estas diferenças entre Hypeel e Zenith não foram verificadas nos meios em que as concentrações de cálcio foram próximas ao meio Murashige e Skoog (utilizado como padrão). Os valores de eficiência mostram-se mais constantes, especialmente para Zenith, em meios com concentrações superiores a 3.00 mM de cálcio.

Os valores de eficiência de utilização do ião cálcio estão relacionados com a percentagem do cálcio para os tecidos da parte aérea. Foram assim calculadas estas percentagens em três situações diferentes (baixa, média e alta concentração de cálcio no meio). Os resultados obtidos estão apresentados Tabela 4.5.

Como pode ver-se na Tabela, para 0.45 mM de cálcio adicionados Hypeel teve 0.42 % de cálcio na matéria seca; valor relativamente baixo quando comparado com os 0.47 % da outra variedade.

Em condição de suprimento adequado de cálcio observaram-se poucas diferenças entre as duas variedades. Todavia quando a quantidade de cálcio no meio foi 10 vezes superior à menor concentração, a variedade Hypeel apresentou uma maior percentagem de cálcio.

Tabela 4.5. Percentagem de cálcio na matéria seca da parte aérea para três concentrações de cálcio no meio

mM de cálcio	Percentagem de cálcio na matéria seca	
	Hypeel	Zenith
0.45	0.42	0.74
2.54	1.27	1.20
4.49	2.56	1.95

4.4 - Discussão dos resultados

Como já foi mencionado, Atkinson, (1991a, b) afirma que: a variação da concentração de cálcio no xilema e a quantidade de cálcio que é translocada para a parte aérea dependem da quantidade de cálcio na rizosfera da planta e das características do genótipo.

Os resultados obtidos nesta experiência corroboram estas afirmações. Assim, o conteúdo de cálcio nos tecidos da parte aérea das plântulas das duas variedades foi mais elevado a medida que a quantidade de cálcio foi incrementada no meio de cultura.

Todavia, observou-se que para idêntica concentração de cálcio no meio de cultura as variedades apresentaram diferentes quantidades de cálcio interno. A variedade Zenith teve para todas as concentrações de cálcio testadas, valores médios de conteúdo de cálcio da parte aérea inferiores quando comparados com Hypeel, mas os valores obtidos para Zenith foram menos variáveis que os de Hypeel. Para as duas concentrações extremas de cálcio no meio (sem adição de cálcio e com 4.49 mM)

Zenith apresenta um conteúdo de cálcio maior e menor respectivamente quando comparado com Hypeel.

Os resultados anteriormente discutidos e analisados permitem inferir que há diferenças acentuadas entre os genótipos estudados.

As raízes das duas variedades apresentaram maiores quantidades de cálcio para as concentrações intermédias de cálcio no meio. Também foi observado uma menor variação do conteúdo de cálcio interno quando comparada com a parte aérea.

A análise da distribuição percentual do cálcio entre a parte aérea e a raiz para os vários níveis de cálcio no meio testadas (Figuras 4.7a e 4.7b) demonstra que mais de 70% do cálcio é translocado para a parte aérea quando a sua quantidade é reduzida ou elevada no meio. Sendo assim pode-se dizer que são as raízes as que possuem o principal papel na regulação interna do cálcio, controlando especialmente a quantidade de cálcio que é transportada para a parte aérea. Todavia verificaram-se diferenças entre as variedades em relação ao padrão anteriormente descrito. A análise pormenorizada dos resultados permitiu constatar as seguintes diferenças:

- a) para baixas concentrações de cálcio no meio, Zenith apresenta uma maior quantidade de cálcio nos tecidos, assim como uma maior percentagem de cálcio translocado para a parte aérea.
- b) para concentrações intermédias (1.05, 1.50 e 2.24 mM) a variedade Zenith possui uma maior quantidade de cálcio nas raízes (quase 60%) em relação a parte aérea.
- c) na variedade Hypeel, a raiz apresenta, em todas os tratamentos efectuados, uma menor percentagem de cálcio que a parte aérea. Esta observação permite inferir que a translocação do cálcio na variedade Hypeel é mais eficiente que em Zenith.
- d) em concentrações superiores a 2.54 mM de cálcio externo as variedades mantêm os valores percentuais de cálcio nos tecidos da parte aérea em aproximadamente 80%; sendo Hypeel a variedade com valores mais elevados de Ca^{2+} na parte aérea comparativamente com Zenith.

- e) a quantidade de cálcio nos tecidos é significativamente maior para Hypeel comparativamente com Zenith.

Em relação aos parâmetros biométricos, todos eles foram afetados pela disponibilidade de cálcio no meio de cultura. Todavia os parâmetros biométricos das raízes foram menos influenciados que os da parte aérea. Esta observação é corroborada por uma menor variação de cálcio interno apresentada pelas raízes das variedades entre os tratamentos testados.

Na sua generalidade os hipocótilos apresentaram maiores comprimentos e significativamente diferentes nos meios com baixa concentração de cálcio (0.45 e 1.05 mM). A medida que se aumentou a concentração de cálcio meio, os valores obtidos para os comprimentos dos hipocótilos foram menores (Figura 4.10a). Esta tendência, inverteu-se a partir de concentrações superiores a 3.00 mM, nas quais se verifica um aumento dos comprimentos dos hipocótilos nas duas variedades. Este maior tamanho pode ser consequência de uma maior absorção de água pelas plântulas, para incrementar o número ou o tamanho dos vacúolos para onde será transportado o cálcio em excesso da célula. Os parâmetros de densidade celular e comprimento das células, corroboraram o maior tamanho e hidratação das células dos hipocótilos que cresceram com mais de 3.00 mM de cálcio no meio de cultura.

Os valores da matéria seca da parte aérea e da raiz mostraram uma redução progressiva a medida que a concentração de cálcio no meio é aumentada (Figuras 4.13a e 4.13b). Para este parâmetro as variações na raiz foram menores que as observadas na parte aérea. Os trabalhos realizados por Moll et al., 1981, mostram que a inibição do crescimento pelo íon Ca^{2+} , por exemplo o crescimento dos hipocótilos de alface é reduzido quase a zero em concentrações de 5 mM de cálcio, enquanto que concentrações de 0.5 mM promovem um rápido crescimento destes hipocótilos. Contudo é necessário distinguir entre o crescimento produzido pelo aumento de biomassa, que no presente trabalho, esteve sempre correlacionado com baixos níveis de cálcio no meio, e o crescimento devido ao alongamento celular

resultante de uma maior quantidade de água na planta, mas que não se traduz num aumento da biomassa.

As observações feitas em relação à biomassa estão em concordância com os resultados obtidos para as plantas que cresceram em concentrações superiores a 3.00 mM de cálcio no meio e que apresentaram valores reduzidos de matéria seca. A explicação plausível é dada por Marschner, 1978 que explica, que os elevados valores de biomassa encontrados em plantas que cresceram em meios com baixa concentração de cálcio, está possivelmente relacionada com a alta permeabilidade das membranas das células radiculares, o que provoca um aumento da difusão dos solutos para o interior dos tecidos. Este facto é fundamental em condições de cultura *in vitro* onde as plântulas dependem da concentração de sacarose no meio.

As plântulas que cresceram nos meios com altos conteúdos de cálcio (mais de 3.00 mM) apresentaram acumulação de cálcio nas raízes. Esta observação é confirmada com os resultados obtidos da distribuição do cálcio entre a parte aérea e a raiz. Deduz-se também que as plântulas de tomate nestes meios (alta concentração de cálcio), apresentem os pontos de intercambio nos tubos xilémicos totalmente saturados de cálcio. Deste modo os valores elevados de cálcio obtidos nos tecidos da parte aérea destas plantas, explicam-se possivelmente pela localização do cálcio nos vacúolos, como sugerido por Schumaker e Sze (1986).

A parte área das plantas que cresceram em meios extremos de concentração de cálcio (baixo e alto) apresentaram valores de comprimento muito próximos, mas com valores diferentes para a matéria seca.

Um dos aspectos importantes a ter em consideração em estudos de afinidade iónica entre génotipos é a eficiência de utilização do nutriente em condições de baixa disponibilidade no solo ou na solução nutritiva. Na maior parte das vezes uma maior eficiência está relacionada principalmente com um maior crescimento da raiz e nalguns casos com um maior transporte entre a raiz e a parte aérea (Lauchli, 1976b).

Os modelos existentes sobre a eficiência de utilização de um nutriente, predizem que esta pode aumentar em consequência da diminuição deste nutriente.

Nestas condições, as plantas geralmente aumentam a capacidade de absorção das raízes e a distribuição das raízes no solo, ao mesmo tempo que diminuem o conteúdo do nutriente nos tecidos (Davidson, 1969a, Ingstad e Lund, 1979 citados por Gutschick, 1993). Os resultados obtidos em relação a razão entre a matéria seca da raiz/matéria seca da parte aérea indicam que Hypeel aumenta a distribuição das raízes no meio em maior medida que Zenith para os meios com baixos suprimentos de cálcio (Tabela 4.3).

Por outro lado a variedade Hypeel apresenta uma maior eficiência na utilização do ião cálcio. A Tabela 4.4 e a Figura 4.20. mostram que para os meios sem adição de cálcio e com 0.45 mM esta variedade apresenta valores de eficiência ($1/F_n$) de 0.23 e 0.19 quando comparado com Zenith em que os valores situaram-se em 0.16 e 0.15 respectivamente, confirmando também a maior diluição do ião nos tecidos de Hypeel.

Segundo Behling et al., (1989) que investigaram as diferenças na eficiência de utilização do cálcio em duas linhas de tomate submetidas a condições de baixa disponibilidade de cálcio, na linha eficiente menos de 0.20% da matéria seca total era formada pelo cálcio, sem que o seu crescimento fosse afectado. Nos resultados desta experiência verifica-se que, para baixas concentrações de cálcio Hypeel apresenta uma percentagem de 0.42% de cálcio na matéria seca, e um crescimento comparável com o de Zenith; sendo, no entanto, neste último genótipo as percentagens de cálcio na matéria seca muito mais elevadas (0.74%).

Conclui-se desta experiência que os estudos de afinidade pelo ião cálcio deverão, pelo acima exposto, serem efectuados em três situações diferentes:

- a) baixa disponibilidade de cálcio no meio,
- b) suprimentos considerados adequados para as plântulas,
- c) elevada concentração de cálcio no meio (mais de 50% da quantidade de cálcio contida no meio de Murashige e Skoog, 1962). Meios com 4.49 mM de cálcio.

No primeiro caso (baixo suprimento de cálcio) o parâmetro que permitiu diferenciar as variedades foi a eficiência na utilização do cálcio. A variedade Hypeel apresentou uma maior eficiência de utilização do cálcio através do aumento da razão entre a matéria seca da raiz e o da parte aérea e diminuindo o conteúdo de cálcio nos tecidos. Contudo, convém referir que a produção de matéria seca da parte aérea foi semelhante para as duas variedades.

Para todos os meios com concentrações médias de cálcio a variedade Hypeel apresentou sempre maiores valores de cálcio nos tecido da parte aérea, e uma menor quantidade de cálcio na raiz. Enquanto que a variedade Zenith, apresentou uma maior quantidade de cálcio na raiz, pelo que a translocação do cálcio até a parte aérea parece ser menos eficiente nesta variedade que em Hypeel.

Por outro lado, a estratégia das variedades para fazer frente ao excesso de cálcio no meio é bem distinta. A variedade Hypeel, parece aumentar os vacúolos (facto inferido pelo maior tamanho das suas células), incrementando o conteúdo de água nos tecidos da parte aérea comparativamente com Zenith. Esta característica permite a esta variedade translocar grandes quantidades de cálcio para a parte aérea (mais de 25 mg por grama de matéria seca). Em contrapartida Zenith a partir de 3.00mM de cálcio no meio, mantém os valores de cálcio da parte aérea dentro de níveis mais ou menos constantes, não sendo observada uma grande variação do tamanho das suas células.

Estas observações permitem supor que a regulação do cálcio não é a mesma para estes genótipos, dependendo também esta regulação da quantidade de cálcio disponível no meio onde se encontram as raízes.

5 - EXPERIÊNCIA 2

5.1 - Introdução e objectivos

As plantas podem absorver pequenas quantidades de azoto da atmosfera por meio da sua folhagem, mas a maior parte do azoto absorvido pelas plantas é retirado do solo. O azoto absorvido pelas raízes é adquirido em formas específicas como: NO_3^- , NH_4^+ e compostos orgânicos como aminoácidos e ureia.

O azoto é o único entre todos os nutrientes que pode ser absorvido pelas plantas em duas formas minerais diferentes, como anião NO_3^- ou catião NH_4^+ . A absorção destas duas formas pode ser afectada por factores internos como por exemplo o nível de azoto e de carboidratos nas plantas e por factores externos como por exemplo a concentração de iões, O_2 , pH e temperatura da rizosfera (Below, 1995).

Ambas as formas podem ser absorvidas pelas plantas, contudo o NO_3^- é a forma predominante de azoto que está disponível para a maioria das plantas cultivadas em condições normais de campo.

A forma de azoto (NH_4^+ ; NO_3^-) que é adicionada ao solo, desempenha um papel importante na relação entre os aniões e os catiões nas plantas.

Aproximadamente 70% dos catiões e dos aniões absorvidos pelas plantas estão representados pelas formas NH_4^+ e/ou NO_3^- (van Beusichem et al., 1988). A absorção predominante de uma destas formas condicionará a relação de absorção dos outros iões presentes na solução do solo. Assim, as plantas supridas predominantemente com NH_4^+ caracterizam-se por uma elevada razão de absorção catião/anião e contrariamente, as plantas supridas com NO_3^- apresentam uma alta razão de absorção anião/catião.

Todavia, na solução externa (solo, solução nutritiva ou meio de cultura) tanto aniões como catiões estão presentes em diferentes concentrações e formas. Portanto

são esperadas varias interacções (por exemplo: competição) entre os iões durante a sua absorção.

Os trabalhos realizados por Shaviv et al., 1987, e Engels e Marschner, 1993 exemplificam a competição por cargas negativas em células individuais, ou na planta inteira respectivamente. Nestes ensaios observou-se a inibição da absorção do K^+ e particularmente do Ca^{2+} e Mg^{2+} pelo amónio comparativamente com o NO_3^- .

O meio de base de Murashige e Skoog (1962), caracteriza-se por uma alta concentração em azoto presente sob duas formas, como nitrato de amónio e nitrato de potássio.

Considerando-se as interacções decorrentes da competição entre a fonte de azoto e a absorção do cálcio, nesta experiência o objectivo foi testar como as modificações realizadas na proporção entre os dois compostos azotados do meio base, influenciariam a absorção do ião cálcio. Deste modo, compararam-se as duas variedades em relação as quantidades de cálcio nos seus tecidos e a variação nos seus parâmetros biométricos, quando submetidas a diferentes concentrações de cálcio, variando-se os conteúdos de NH_4^+ e NO_3^- nos meios base.

5.2 - Material e Métodos

5.2.1 - Meios de cultura

As modificações efectuadas na composição do meio de Murashige e Skoog (1962*), consistiram nesta experiência no aumento e diminuição das quantidades de cálcio e na alteração da relação entre o NO_3^- e NH_4^+ , que no meio de Murashige e Skoog é de 2:1. Deste modo obtiveram-se 10 meios diferentes, 5 dos quais com NO_3^- e NH_4^+ numa relação de 2:1 (39.4 mM de NO_3^- + 20.6 mM de NH_4^+) estes foram os meios **A**; e 5 onde a única fonte de azoto foram 39.4 mM de NO_3^- , meios **B**. A Tabela 5.1 mostra a composição final em cálcio $CaCl_2 \cdot H_2O$, NO_3NH_4 e NO_3K em $mg\ l^{-1}$ e a Tabela 5.2 a composição em mM.

As quantidades de micronutrientes não foram alteradas neste ensaio, portanto as suas concentrações corresponderam as do meio de Murashige e Skoog (1962), ver Anexo I.

Tabela 5.1 - Composição da solução de macronutrientes em mg l^{-1} , meios A e B.

	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
NO ₃ NH ₄	1650	-	1650	-	1650	-	1650	-	1650	-
KNO ₃	1900	3975	1900	3975	1900	3975	1900	3975	1900	3975
CaCl ₂ ·2H ₂ O	660	660	550	550	440	440	330	330	220	220
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170
ClK	1491	-	1491	-	1491	-	1491	-	1491	-

Para uma mesma quantidade de cálcio nos meios de base foram usadas duas fontes de azoto (A) com amônio e nitrato numa relação 2:1; (B) só nitratos. * Meio de base de Murashige e Skoog 1962.

Tabela 5.2 - Composição da solução de macronutrientes em mM, meios A e B.

	1A	1B	2A	2B	3A*	3B	4A	4B	5A	5B
NO ₃ ⁻	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4
NH ₄ ⁺	20.6	-	20.6	-	20.6	-	20.6	-	20.6	-
Ca ²⁺	4.49	4.49	3.74	3.74	3.00	3.00	2.24	2.24	1.50	1.50
K ⁺	40.1	40.6	40.1	40.6	40.1	40.6	40.1	40.6	40.1	40.6
Cl ⁻	24.49	4.49	23.74	3.79	23.00	3.00	22.24	2.24	21.50	1.50

(A) Relação NO₃⁻/NH₄⁺ ≅ 2:1; (B) 39.4 mM. de NO₃⁻

Também foram testadas duas outras alterações na relação entre o NO₃⁻ e o NH₄⁺, permanecendo as quantidades de cálcio idênticas as referidas anteriormente.

Para os meios designados de **C** a relação NO₃⁻/NH₄⁺ foi de 1:1 (20.6 mM de NO₃⁻ + 20.6 mM de NH₄⁺) e para os meios **D**, a única fonte de azoto foi o nitrato de potássio (neste caso com 20.6 mM de NO₃⁻).

A Tabela 5.3 mostra as quantidades de macronutrientes dos meios base C e D, em mg l^{-1} e a Tabela 5.4 em mM por litro.

Tabela 5.3. Composição da solução de macronutrientes em mg l^{-1} , meios C e D.

	6C	6D	7C	7D	8C	8D	9C	9D	10C	10D
NO_3NH_4	1650	-	1650	-	1650	-	1650	-	1650	-
KNO_3	-	2081	-	2081		2081		2081		2081
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	660	660	550	550	440	440	330	330	220	220
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370
KH_2PO_4	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170
ClK	2894	1359	2894	1359	2894	1359	2894	1359	2894	1359

As formulações (C) contém as duas fontes de azoto numa relação de 1:1, as formulações (D) só contém nitrato como única fonte de azoto adicionada ao meio.

Tabela 5.4. Composição da solução de macronutrientes em mM, meios C e D.

	6C	6D	7C	7D	8C	8D	9C	9D	10C	10D
NO_3^-	20.6	20.6	20.6	20.6	20.6	20.6	20.6	20.6	20.6	20.6
NH_4^+	20.6	-	20.6	-	20.6	-	20.6	-	20.6	-
Ca^{2+}	4.49	4.49	3.74	3.74	3.00	3.00	2.24	2.24	1.50	1.50
K^+	40.1	40.6	40.1	40.6	40.1	40.6	40.1	40.6	40.1	40.6
Cl^-	24.49	4.49	23.74	3.79	23.00	3.00	22.24	2.24	21.50	1.50

(C) Relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ = 1:1$; (20.6 mM de $\text{NO}_3^- + 20.6$ mM de NH_4^+), (D) 20.6 mM de NO_3^-

5.3 - Resultados

5.3.1 - Conteúdo de cálcio nos tecidos

5.3.1.1 - Parte aérea

Comparou-se primeiramente o efeito na absorção do ião cálcio em relação as duas fontes de azoto (A) $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ \cong 2:1$ e (B) 39.4 mM. de NO_3^- para diferentes concentrações de cálcio no meio (4.49; 3.74; 3.00; 2.24 e 1.50 mM de cálcio).

A análise de variância para o cálcio na parte aérea apresenta-se no Quadro 1 do Anexo VII. Neste verifica-se que o conteúdo de cálcio interno varia em função das quantidades de cálcio adicionadas no meio de cultura. Também, a concentração interna de cálcio foi influenciada pela fonte de azoto incorporada no meio de cultura (Figura 5.1). Assim como se observou na experiência 1, a variedade Hypeel apresenta uma média significativamente superior a Zenith para a quantidade de cálcio nos tecidos da parte aérea (Figura 5.1).

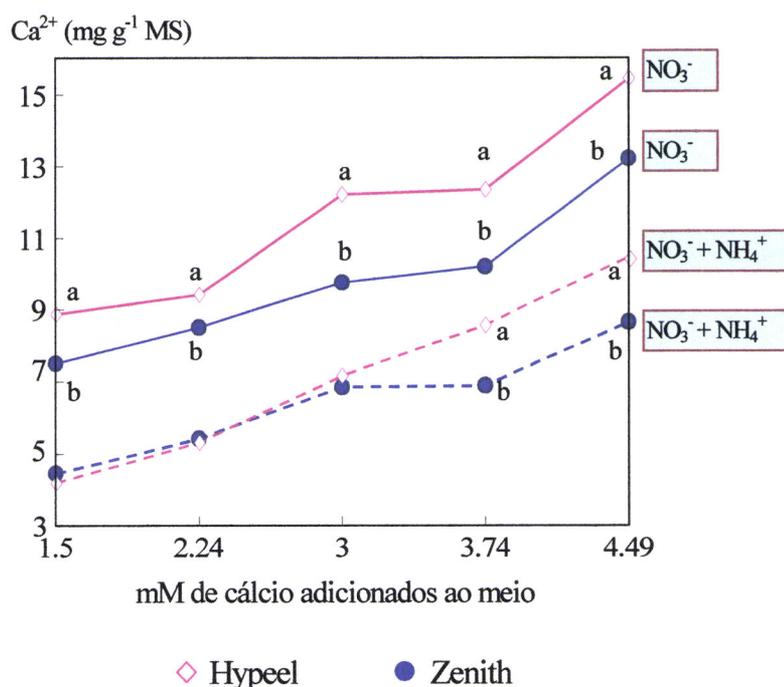


Figura 5.1 - Conteúdo de cálcio na parte aérea (mg g^{-1} MS) para plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith, em função da concentração de cálcio no meio (mM). As curvas (---) representam os valores de cálcio interno para os meios A ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ \cong 2:1$). As curvas (—) representam os valores de cálcio interno para os meios B (NO_3^- como única fonte de azoto). **a**, **b**: diferenças significativas entre variedades para cada nível de cálcio no meio e fonte de azoto.

A análise estatística, também mostra diferenças significativas no conteúdo de cálcio interno para as plântulas da *mesma variedade* quando submetidas as duas formas de azoto com a mesma quantidade de cálcio externo (Figura 5.1).

Os valores mais elevados foram obtidos quando o azoto foi aplicado em forma de NO_3^- na ausência de NH_4^+ . Como anteriormente referido, o conteúdo médio de

cálcio da variedade Hypeel foi significativamente superior ao conteúdo médio de cálcio de Zenith, para as duas fontes de azoto utilizada na constituição dos meios base. Todavia, a medida que a quantidade de cálcio adicionado ao meio foi decrescendo, as diferenças observadas entre as variedades não foram significativas, não havendo quase diferenças entre Hypeel e Zenith para 3.00, 2.24 e 1.50 mM de cálcio quando o meio continha NH_4^+ .

A Figura 5.2, mostra que a diferença entre as variedades em relação a quantidade média de cálcio nos tecidos da parte aérea foi maior quando a fonte de azoto utilizada foi o NO_3^- .

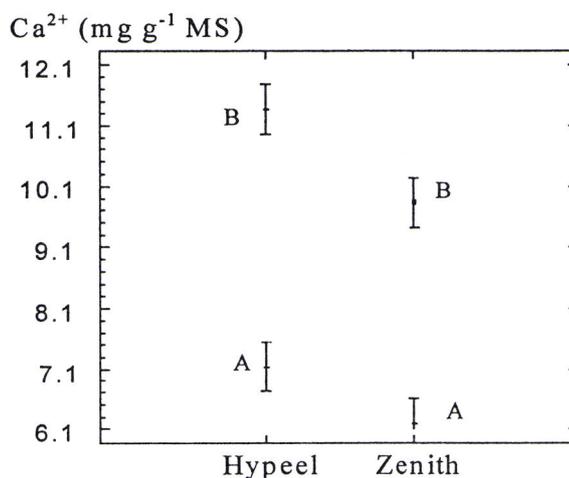


Figura 5.2 - Resultados da análise de variância para o conteúdo de cálcio nos tecidos da parte aérea em função da interação entre as fontes de azoto e as variedades. **A**- relação de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ \cong 2:1$ e **B**- NO_3^- como única fonte de azoto.

As Figuras 5.3 e 5.4 mostram claramente o efeito inibidor do NH_4^+ nas duas variedades, em relação a absorção do cálcio em todos os meios testados. Este efeito observa-se tanto nos meios em que a relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ foi de 2:1, como naqueles nos quais a relação foi de 1:1 (meios C das Tabelas 5.3 e 5.4). Se bem que nos primeiros o efeito inibidor foi menos marcante.

Tal como foi observado na experiência 1, a variedade Zenith apresentou sempre valores de cálcio interno menores quando comparados com os valores da variedade Hypeel em todos os meios testados.

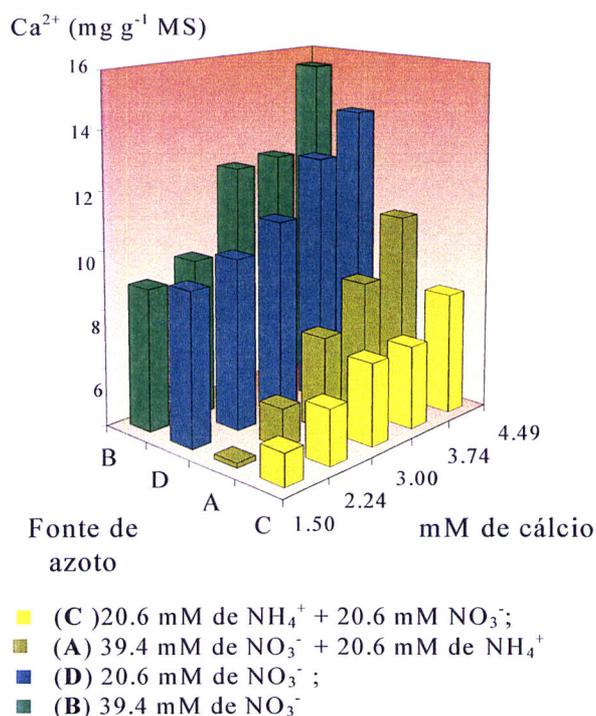


Figura 5.3 - Variação na quantidade de cálcio na parte aérea (mg g⁻¹ MS) das plântulas da variedade Hypeel em função das quatro fontes de azoto testadas.

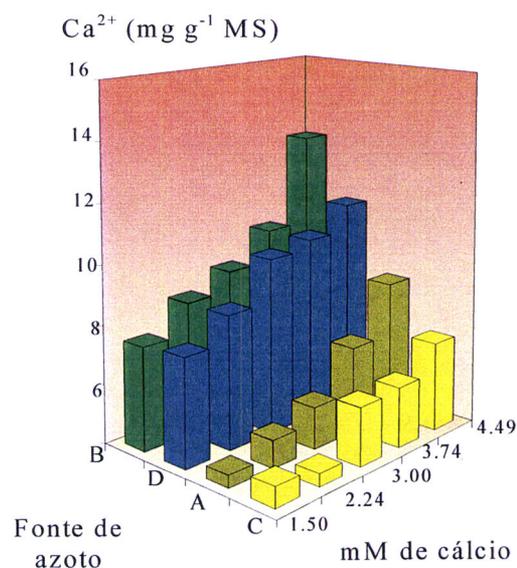


Figura 5.4 - Variação na quantidade de cálcio na parte aérea (mg g⁻¹ MS) das plântulas da variedade Zenith em função das quatro fontes de azoto testadas.

5.4.1.2 - Raiz

O conteúdo de cálcio nas raízes variou não só em função da quantidade de cálcio no meio, mas também em relação a fonte de azoto utilizada tal como aconteceu na parte aérea.

As Figuras 5.5 e 5.6 (e o Quadro 4 do Anexo VII) mostram os resultados do conteúdo de cálcio para os tecidos da raiz, para as duas variedades, em função da fonte de azoto utilizada e da quantidade de cálcio adicionada ao meio de cultura.

Na Figura 5.5 apresenta-se o resultado do conjunto dos dados (duas variedades) em função do meio (A) que continha NO₃⁻ + NH₄⁺, e na Figura 5.6 os valores relativos aos meios (B) com NO₃⁻ como única fonte de azoto.

Comparando-se as Figuras 5.5 e 5.6, observa-se que o conteúdo médio de cálcio nos tecidos foi maior quando os meios continham NO₃⁻ isto para todas as concentrações de cálcio testadas.

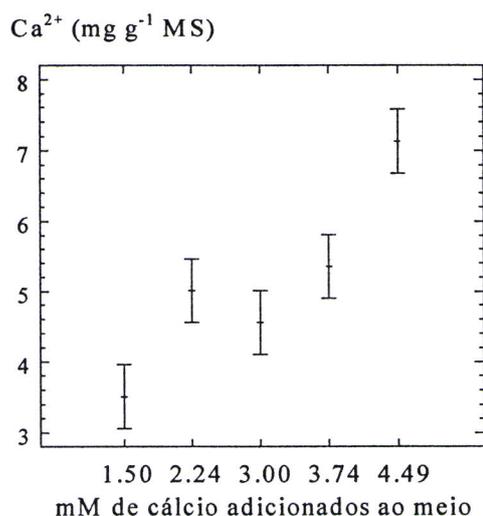


Figura 5.5 - Intervalos de confiança (95% dms) para o factor cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS) em função do conteúdo de cálcio no meio (mM) para os meios com 39.4 mM de NO_3^- + 20.6 mM de NH_4^+ . Valores médios de ambas as variedades.

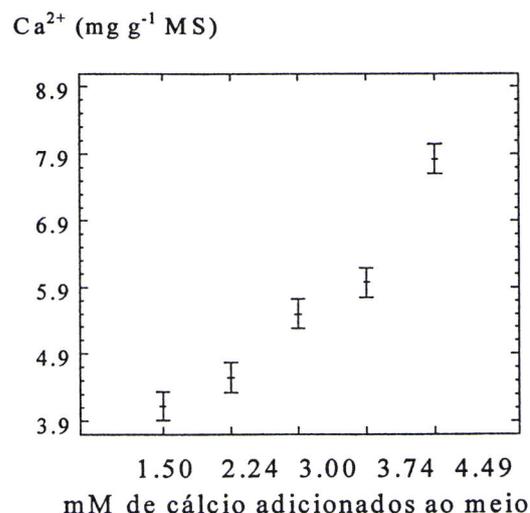


Figura 5.6 - Intervalos de confiança (95% dms) para o factor cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS) em função do conteúdo de cálcio no meio (mM) para os meios com 39.4 mM de NO_3^- . Valores médios de ambas as variedades.

Não foram observadas diferenças significativas entre as médias das variedades para o conteúdo de cálcio na raiz quando foram adicionados NO_3^- + NH_4^+ , como fonte de azoto, (Fig. 5.7). Todavia, o conteúdo médio de cálcio das raízes de Hypeel foi significativamente superior ao conteúdo médio de cálcio das raízes de Zenith para os meios que só continham NO_3^- (Fig. 5.8). Pode-se assim afirmar que também nas raízes a presença de NH_4^+ diminuiu as diferenças entre as variedades.

A Figura 5.9 mostra as diferenças no conteúdo de cálcio entre as raízes de Hypeel e Zenith, para os meios nos quais a única fonte azoto disponível foi o NO_3^- .

Quando a fonte de azoto continha NH_4^+ as curvas obtidos foram semelhantes aos encontrados na experiência 1. Contudo, nos tratamentos em que o NO_3^- foi a única fonte de azoto a quantidade de cálcio encontrada na raiz aumentou à medida que a concentração de cálcio no meio foi incrementada (Fig. 5.9).

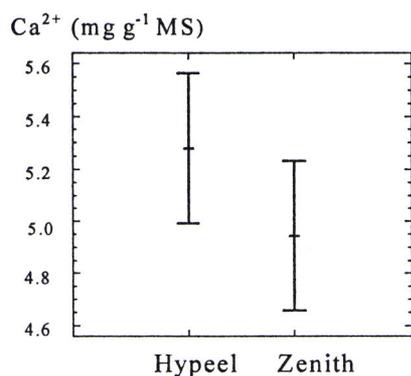


Figura 5.7 - Intervalos de confiança (95% dms) para a média do conteúdo de cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS) em função das variedades quando fonte de azoto foi $39.4 \text{ mM de NO}_3^- + 20.6 \text{ mM de NH}_4^+$

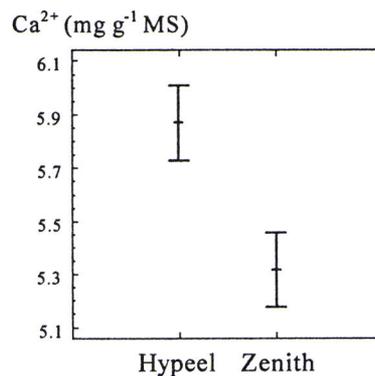


Figura 5.8 - Intervalos de confiança (95% dms) para a média do conteúdo de cálcio nos tecidos da raiz (mg g^{-1} MS) em função das variedades quando fonte de azoto foi $39.4 \text{ mM de NO}_3^-$

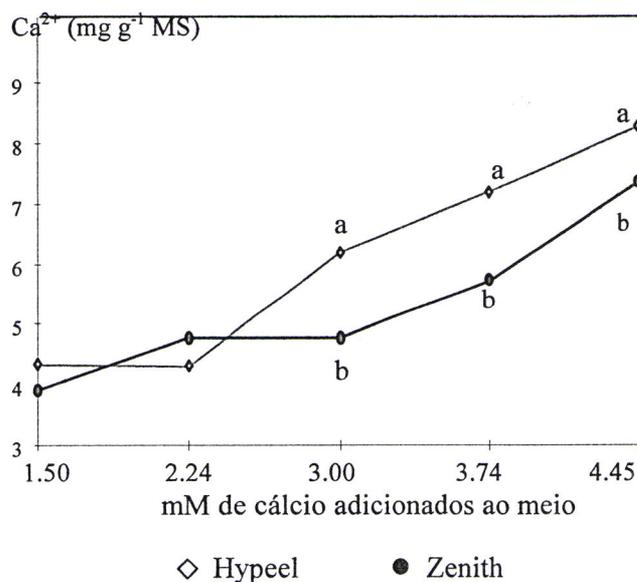


Figura 5.9 - Conteúdo médio de cálcio das raízes (mg g^{-1} MS) de Hypeel e Zenith em função das diferentes quantidades de cálcio adicionado (mM) para os meios que só continham NO_3^- como única fonte de azoto. **a, b:** diferenças significativas entre as variedades.

5.3.2 - Parâmetros biométricos

5.3.2.1 - Comprimento da parte aérea (hipocótilo)

Para efeitos de comparação da quantidade de cálcio absorvido utilizaram-se os quatro meios acima referidos (A,B,C,D), entretanto para a descrição das possíveis

alterações dos parâmetros biométricos em função do conteúdo de cálcio e da fonte de azoto, utilizaram-se os meios A (relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ é de 2:1) e B (presença só de NO_3^-).

O comprimento dos hipocótilos das duas variedades variou em função do conteúdo de cálcio adicionado ao meio de cultura e da fonte de azoto utilizada. No caso dos meios com adição de NH_4^+ observou-se uma diferença significativa entre as variedades (Quadro 2 do Anexo VII).

O comprimento dos hipocótilos diminuiu nas duas variedades com a presença de NH_4^+ no meio. Por outro lado quando foi utilizado o NO_3^- como única fonte de azoto as diferenças no comprimento devidas a concentração diferente de cálcio foram menos acentuadas (Figuras. 5.10 e 5.11). Para as duas fontes de azoto a variedade Zenith apresentou uma média do comprimento dos hipocótilos superior aos da variedade Hypeel, porem estas diferenças não foram significativas.

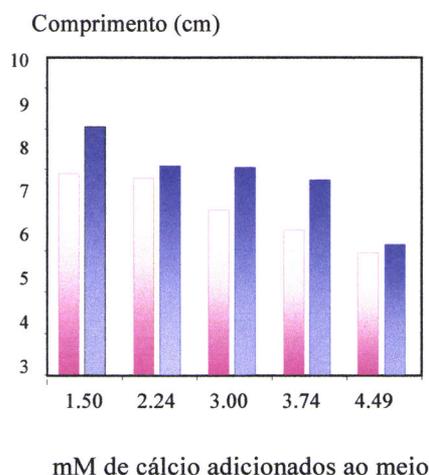


Figura 5.10 - Efeito da fonte de azoto e da concentração de cálcio no meio (mM) sobre o comprimento (cm) dos hipocótilos das plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith, para os meios com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$.

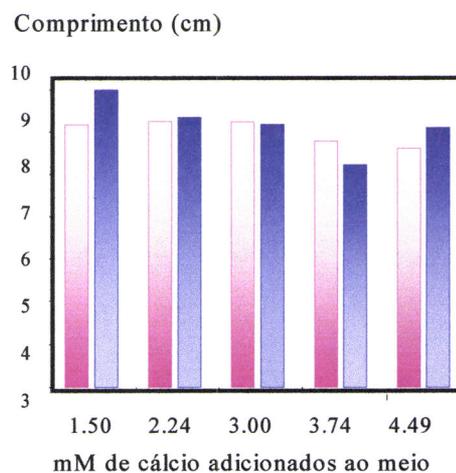


Figura 5.11 - Efeito da fonte de azoto e da concentração de cálcio no meio (mM) sobre o comprimento (cm) dos hipocótilos das plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith, para os meios com NO_3^- .

5.3.2.2 - Comprimento da raiz

A análise de variância para o comprimento da raiz pode ser consultada no Quadro 5 do Anexo VII. Os comprimentos das raízes das duas variedades

apresentaram uma menor variabilidade quando comparados com os comprimentos da parte aérea (facto também observado na primeira experiência). Todavia os resultados mostram que houve maiores diferenças entre o comprimento das raízes de Hypeel e Zenith nos meios que continham NH_4^+ (resultados semelhantes foram verificados na parte aérea), Figura 5.12.

Nos meios com NO_3^- como única fonte azoto disponível o comprimento das raízes das duas variedades foi maior e os valores obtidos foram mais homogêneos. As diferenças de comprimento foram insignificantes apesar das diferenças na concentração externa de cálcio, Figura. 5.13.

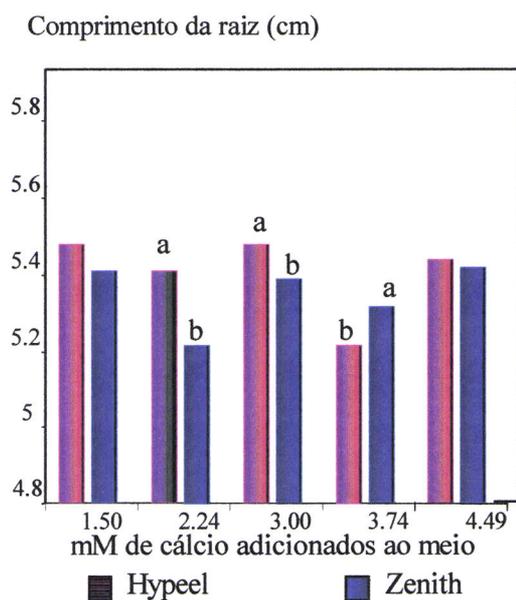


Figura 5.12 - Efeito da fonte de azoto e da concentração de cálcio no meio sobre o comprimento (cm) da raiz das plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith, para os meios com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$.

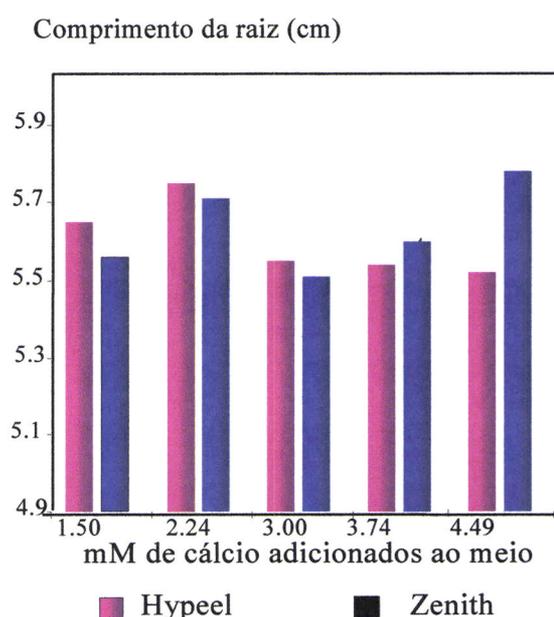


Figura 5.13 - Efeito da fonte de azoto e da concentração de cálcio no meio sobre o comprimento (cm) da raiz das plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith, para os meios com NO_3^- .

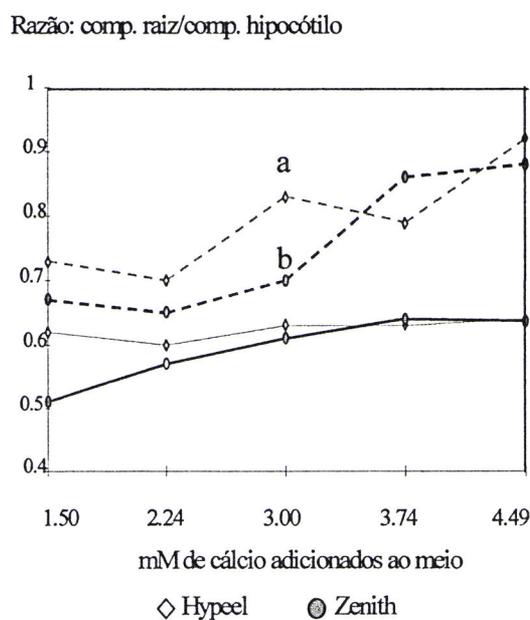
5.3.2.3 - Razão: comprimento da raiz/comprimento do hipocótilo

Os resultados obtidos da razão comprimento da raiz/comprimento do hipocótilo apresentaram uma diferença maior em relação aos outros parâmetros biométricos analisados (nas duas variedades) para os meios que continham NH_4^+ ,

como consequência do menor crescimento da parte aérea em relação ao crescimento da raiz (Fig. 5.14).

Analisando-se os resultados obtidos deduz-se que os comprimentos das raízes foram menos afectadas que os da parte aérea quer em relação as quantidades de cálcio no meio, quer em relação á fonte de azoto utilizada. Os caules apresentaram uma diminuição do seu comprimento quando a quantidade de cálcio no meio foi maior.

Nos meios que continham só NO_3^- tiveram uma razão raiz/hipocótilo menor que aqueles onde o NH_4^+ interferiu na absorção do cálcio.



A razão raiz/hipocótilo foi maior para a variedade Hypeel (nas duas fontes de azoto), até 3.00 mM de cálcio no meio; sendo quase idêntica para as duas variedades para concentrações superiores a 3.00 mM de cálcio no meio independentemente da fonte de azoto.

Figura 5.14 - Razão dos comprimentos raiz/hipocótilo para Hypeel e Zenith em relação as duas fontes de azoto e dos mM de cálcio adicionados ao meio. (---) meios com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ (meios A) ; (—) meios com NO_3^- como única fonte de azoto (meios B).

5.3.2.4 - Matéria seca da parte aérea

A matéria seca da parte aérea das duas variedades decresce a medida que se aumenta o conteúdo de cálcio no meio. Estes resultados confirmam os resultados obtidos na experiência 1. Contudo, não foram encontradas diferenças significativas

entre as variedades para idêntica concentração de cálcio no meio, quer quando foi adicionado NH_4^+ , quer quando a única fonte de azoto foi o NO_3^- .

Como foi observado na experiência 1, os valores de matéria seca da variedade Zenith foram superiores para a maioria dos meios testados, especialmente quando a fonte de azoto foi só o NO_3^- quando comparados com os valores da variedade Hypeel. O Quadro 3 do Anexo VII e a Figura 5.15 mostram os resultados da análise de variância.

Na Fig. 5.15 observa-se claramente que os valores obtidos para a matéria seca das duas variedades foram significativamente inferiores para os meios com adição de NH_4^+ .

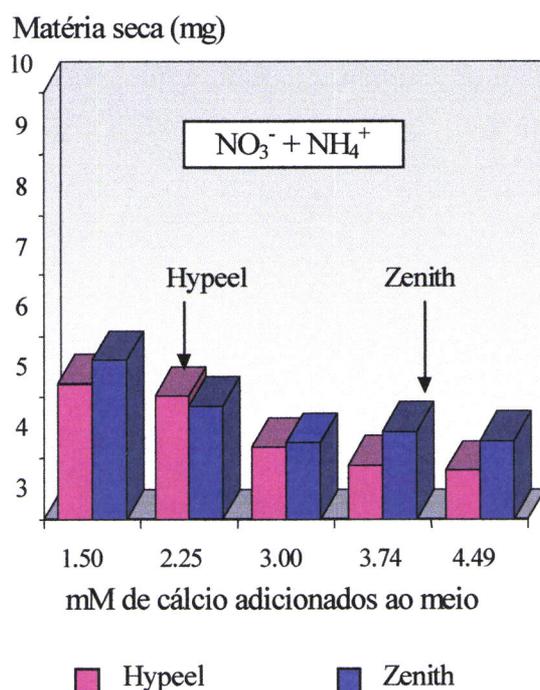


Figura 5.15a - Variações na matéria seca da parte aérea (mg) para os meios que continham 39.4 mM de NO_3^- + 20.6 mM de NH_4^+ (meios A) em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio (mM).

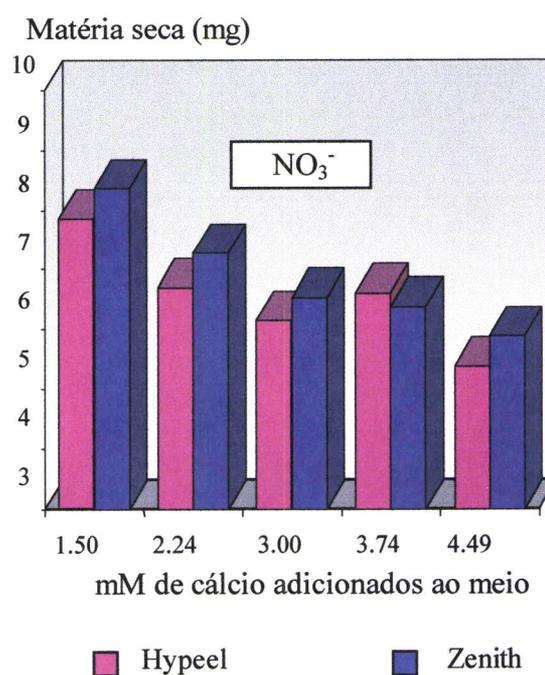


Figura 5.15b - Variações na matéria seca da parte aérea (mg) para os meios que continham 39.4 mM de NO_3^- (meios B) em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio (mM).

5.3.2.5 - Matéria seca da raiz

Os resultados da matéria seca (Quadro 6 do Anexo VII) mostram que só existiram diferenças significativas entre os valores da matéria seca das raízes em função da fonte de azoto utilizada e em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio de cultura. Contudo, não se verificaram diferenças entre as variedades para idêntica concentração de cálcio no meio e fonte de azoto (Fig. 5.16).

Os menores valores obtidos para a matéria seca da raiz corresponderam aos meios com maior conteúdo de cálcio. As raízes que apresentaram maiores valores de matéria seca correspondem aos meios com NO_3^- como única fonte de azoto. Observaram-se diferenças significativas para a mesma variedade entre as fontes de azoto testadas.

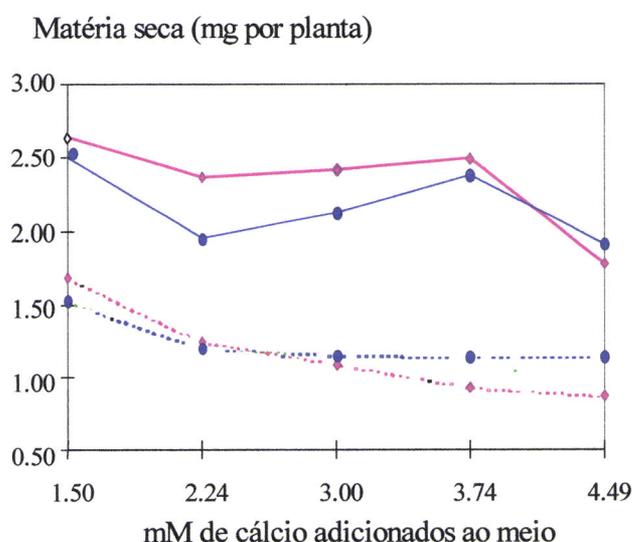


Figura 5.16. Variações na matéria seca da raiz em função das fontes de azoto e do conteúdo de cálcio (mM) no meio, para plântulas de 15 dias das variedades Hypeel e Zenith. As curvas (-----) representam os meios 39.4 mM de NO_3^- + 20.6 mM de NH_4^+ (meios A) As curvas (—) representam os meios que só continham 39.4 mM de NO_3^- (meios B).

5.4.3 - Eficiência de utilização do ião cálcio em função da fonte de azoto utilizada

Analisando-se a quantidade percentual de cálcio presente na matéria seca da parte aérea para cada concentração de cálcio em função das fontes de azoto (Tabela 5.5) pode observar-se que nos meios com NO_3^- como única fonte de azoto as duas

variedades apresentaram uma maior percentagem de cálcio na matéria seca (Tabela 5.5B).

A variedade Hypeel apresentou sempre uma maior percentagem de cálcio na matéria seca da parte aérea comparada com a variedade Zenith para os meios com NO_3^- . Também foi observada esta tendência para a maioria dos meios que continham NH_4^+ quando as quantidades de cálcio no meio foram superiores a 3.00 mM.

Tabela 5.5 - Percentagem de cálcio na matéria seca das variedades em função da quantidade de cálcio no meio de cultura para as duas fontes de azoto utilizada.

Meios (A) Fonte de azoto $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$			Meios (B) Fonte de azoto NO_3^-		
mM de cálcio	% de Ca^{2+}		mM de cálcio	% de Ca^{2+}	
	Hypeel	Zenith		Hypeel	Zenith
1.50	0.42	0.44	1.50	0.89	0.75
2.24	0.53	0.54	2.24	0.94	0.85
3.00	0.71	0.68	3.00	1.22	0.98
3.74	0.86	0.69	3.74	1.15	1.02
4.49	1.05	0.86	4.49	1.54	1.32

Fazendo uma análise da Tabela 5.5, pode-se observar que na variedade Hypeel 0.86 % da matéria seca da parte aérea foi constituído por cálcio no meio com uma concentração de 3.74 mM de cálcio em presença de NH_4^+ . Valor similar ao anteriormente descrito foi obtido quando foram adicionados 1.50 mM de cálcio nos meios em que a única fonte de azoto foi o NO_3^- .

Devido aos resultados obtidos sobre as percentagens de cálcio presentes na matéria seca, foram analisadas várias funções de regressão para a quantidade de matéria seca produzida por cada mg de cálcio na matéria seca dos tecidos da parte aérea (eficiência de utilização do ião).

Os valores Y e X correspondem respectivamente a:

Y= matéria seca produzida por mg de Ca^{2+} na matéria seca

X= quantidade de Ca^{2+} na matéria seca.

De entre as funções de regressão testadas a que apresentou maiores coeficientes de correlação entre Y e X foi a função $Y=A*X^B$.

A Fig. 5.17 mostra as curvas de regressão e o R^2 para as duas variedades e para as fontes de azoto.

Como pode ver-se nas curvas de regressão para idêntica concentração de cálcio nos tecidos dos hipocótilos a quantidade de matéria seca produzida por mg de Ca^{2+} foi inferior para as duas variedades nos meios que continham NH_4^+ . Todavia, para os valores de cálcio utilizados nesta experiência, não foram observadas diferenças significativas entre as variedades para os valores de eficiência, independentemente da fonte de azoto utilizada.

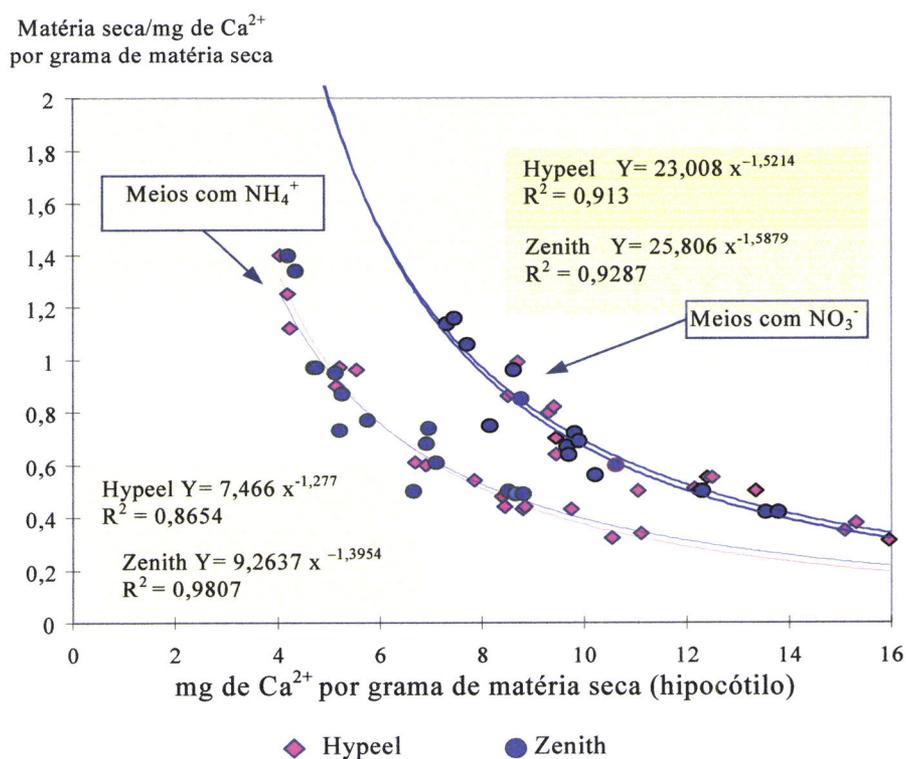


Figura 5.17. Curvas de regressão e respectivos coeficientes para Hypeel e Zenith em função das fontes de azoto (com NH_4^+ e NO_3^- meios A.) e só com NO_3^- (meios B).

5.4 - Discussão dos resultados

Segundo Chaillou et al., (1991) a forma de azoto disponível pode ter uma profunda influência no crescimento e no metabolismo das plantas. Quando o amónio ou o nitrato como fonte única de azoto é melhor em termos de crescimento e produtividade depende de vários factores (Kirkby, 1981, citado por Marschner, 1995). Entre estes factores um dos mais importantes é a espécie, com os padrões gerais de *calcífugas* (plantas adaptadas à solos ácidos e plantas adaptadas a baixos potenciais redox, como é o caso do arroz; estas plantas têm preferência pelo amónio. Em contraste as *calcícolas* que preferem viver em solos calcários (solos com alto pH) utilizam preferencialmente o nitrato (Kirkby 1967 citado por Marschner, 1995).

No entanto e como regra geral são maiores os crescimentos e produções nas plantas que crescem com a combinação de ambas as formas de azoto, e segundo Grimes e Hodges, 1990 particularmente nas plantas que crescem em cultura in vitro.

O crescimento da maioria das plantas é menor quando a fonte de azoto disponível é o NH_4^+ , comparativamente com o NO_3^- (Gashaw e Mugwira, 1981 citados por Below, 1995), Contudo, as possíveis causas deste menor crescimento são ainda pouco conhecidas (Mehrer e Mohr, 1989 citados por Engels e Marschner, 1993).

Por outro lado, como o azoto é quantitativamente o nutriente mais importante para o crescimento, a forma em que ele se encontra disponível ou é ministrado desempenha um papel fundamental na relação catião-anião na planta (Van Beusichem et al., 1988). Esta observação é particularmente válida especialmente para os catiões K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , cuja absorção é menor nas plantas que são supridas com NH_4^+ em comparação com aquelas que são supridas com NO_3^- . No caso da presente experiência, a diminuição da absorção do Ca^{2+} é bem evidente quando se incorporou NH_4^+ nos meios de cultura. Entretanto, como se pode deduzir das Fig. 5.3 e 5.4 o efeito inibidor do NH_4^+ é menos evidente a medida que se incrementa a quantidade de NO_3^- no meio.

Nas plantas em que o azoto é fornecido como NO_3^- , a assimilação do azoto pode ocorrer tanto a nível das raízes como da parte aérea, dependendo da espécie e das condições ambientais (Andrews et al., 1992). Assim, nas plantas anuais (como é o caso do tomate para indústria) pelo menos uma parte do azoto é translocado até a parte aérea em forma de NO_3^- . Deste modo, as necessidades em cationes inorgânicos para a manutenção do balanço de cargas é maior nestas plantas que nas plantas que absorvem outras formas de azoto (Engels e Marschner, 1993). Esta observação poderia explicar os resultados obtidos para as maiores quantidades de cálcio encontradas na parte aérea das plantas cujos meios continham somente NO_3^- comparativamente com aquelas que continham no meio as duas fontes de azoto.

Por outro lado, nas plantas supridas com NH_4^+ o azoto é incorporado em compostos amino-N no interior das raízes. O transporte do azoto no xilema ocorre então sob a forma de azoto reduzido, presumivelmente como glutamina ou asparagina ou ambas (Arnozis e Findenegg, 1986; Allen et al., 1988; Van Beusichen et al., 1988 citados por Engels e Marschner, 1993). As cargas eléctricas destes aminoácidos dependem do pH da seiva do xilema, porém, diversos estudos indicam que menos de 1% destes compostos com N-reduzido estão carregados electricamente, se bem que os aniões H_2PO_4^- , Cl^- e SO_4^{2-} que se encontram em maior numero nas plantas com NH_4^+ , não o são em quantidade suficiente para compensar o efeito da menor concentração dos NO_3^- . Devido a necessidade de manutenção do balanço de cargas na seiva do xilema, a baixa concentração de aniões nas plantas que possuem altas quantidades de amónio torna-se um factor limitante para a entrada de cationes no xilema (Engles e Marschner, 1993). Em concordância com esta afirmação e devido ao facto do ião Ca^{2+} não ser retranslocado no floema, os baixos níveis de cálcio translocados pelo xilema podem resultar nas plantas supridas com NH_4^+ numa redução da concentração do Ca^{2+} na parte aérea (Fig. 5.3 e 5.4).

O trabalho realizado por Engels e Marschner (1993) sobre a influência das formas de azoto na absorção radicular e na translocação de cationes no xilema do exsudado de milho, mostrou que o crescimento da parte aérea não foi afectado pela

forma de azoto ministrada. Porém, o crescimento das raízes foi influenciado pela forma de azoto utilizada, sendo o crescimento menor nas plantas que foram supridas com NH_4^+ em comparação com as supridas com NO_3^- . Os resultados obtidos no presente trabalho (Fig. 5.14) mostraram que tanto a parte aérea como a raiz apresentaram menor crescimento quando o meio continha NH_4^+ , conseqüentemente a razão entre o comprimento da raiz e da parte aérea foi maior, devido principalmente ao escasso crescimento da parte aérea.

Quando a fonte de azoto utilizada continha NH_4^+ , tanto os valores de comprimento como os valores de matéria seca das duas variedades foram menores que os valores obtidos utilizando-se NO_3^- como única fonte de azoto.

Através da comparação dos quatro meios testado verifica-se que as diferenças nos parâmetros biométricos foram mais acentuadas entre os meios que continham NH_4^+ em relação aos que só continham NO_3^- e pouco evidentes entre os meios com idêntica fonte de azoto mas com diferentes concentrações (por exemplo, entre os meios com 20,6 mM e os com 39,4 mM de NO_3^-).

As curvas de regressão para a eficiência de utilização do ião cálcio mostraram que as duas variedades foram mais eficientes na utilização do ião quando os meios continham NO_3^- , portanto infere-se que a produção líquida de biomassa foi maior nos meios com NO_3^- como única fonte de azoto.

Estes resultados relativos a produção de biomassa não estão de acordo com os resultados descritos na bibliografia, por exemplo, o trabalho realizado por Tsai et al., (1980) em milho. No caso do milho a produção foi incrementada entre 11 - 14 % (em plantas cultivadas em hidroponia) quando supridas com uma mistura de NO_3^- e NH_4^+ , comparativamente com plantas que cresceram em soluções que só continham NO_3^- .

Em plantas de tomateiro adultas também foi observada uma maior produção com a combinação das duas fontes de azoto. Porém e como demonstram os trabalhos de Xu et al., (1992) a influencia relativamente vantajosa da mistura das duas fontes de azoto sobre o crescimento depende fortemente da concentração externa. Assim

quando a concentração das duas formas de azoto é baixa (1mM) as diferenças notadas no crescimento são pequenas. Todavia, à medida que se aumenta a concentração externa (5mM), as vantagens do NO_3^- como única fonte de azoto é incrementada (Gerendás e Sattelmacher, 1990) e a diminuição do crescimento pelo NH_4^+ torna-se mais evidente, devido possivelmente à toxicidade do NH_4^+ para as plantas, ou a alta acidificação do meio onde se encontram as raízes (Smith e Wishire, citados por Marschner, 1995).

No presente trabalho as concentrações foram superiores a 20 mM de cada fonte de azoto, deste modo os resultados obtidos estariam de acordo com Gerendás e Sattelmacher, 1990. Como estas altas concentrações de NH_4^+ são frequentes nas formulações dos meios para culturas *in vitro*, é importante ter em consideração a sua interação com outros iões, como por exemplo com o cálcio.

A proporção ideal das duas fontes de azoto dependerá fundamentalmente do pH da concentração externa, da espécie em questão e de outros factores ambientais como por exemplo, a temperatura.

Como conclusão pode-se afirmar que a forma de azoto influenciou a quantidade de cálcio absorvida e particularmente a quantidade translocada para a parte aérea nas duas variedades, conseqüentemente influenciou os parâmetros biométricos, contudo não foi alterada a maior afinidade pelo cálcio apresentada pela variedade Hypeel.

6 - EXPERIÊNCIA 3

6.1 – Introdução e objectivos

Tanto o cálcio como os carboidratos são indispensáveis para a construção das estruturas celulares e para a capacidade de alongamento e divisão celular (Marmé, 1983; Demarty, Morvan e Thellier, 1984).

A relação entre cálcio e carboidratos tem sido pouco estudada (Greger e Bertell, 1992; Schulte-Baukloh e Fromm, 1993).

Na revisão bibliográfica efectuada não foram encontrados trabalhos sobre a relação entre os níveis de cálcio e as fontes de carboidratos que são utilizadas na cultura *in vitro*, portanto nesta experiência o objectivo foi estudar a interacção entre os níveis de cálcio e de sacarose no meio de cultura.

6.2 - Material e Métodos

Nesta experiência foram utilizados os mesmos materiais e métodos que os descritos no Capítulo II (Material e Métodos). Contudo para estudar a interacção proposta foram feitas modificações no meio de base (Murashige e Skoog, 1962), nas quantidades de cálcio e no conteúdo de sacarose. A Tabela 6.1, mostra a combinação destes dois factores por tratamento.

Tabela 6.1 - Conteúdos de cálcio (mM) e de sacarose (g e mM) por tratamento.

Cálcio (mM)	Sacarose por litro de meio		
	sem sacarose	10 g (29.2 mM)	20 g (58.4 mM)
0.45	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3
4.5	Trat. 4	Trat. 5	Trat. 6

Para cada concentração de cálcio testaram-se 3 níveis de sacarose no meio. Para cada variedade foram efectuadas 3 repetições (de 24 tubos cada) por tratamento.

Devido à complexidade da análise de factores múltiplos, optou-se por testar só dois níveis de cálcio, o máximo que se utilizou em todas as experiências anteriores, isto é 4.5 mM e a décima parte desta concentração (0.45 mM), que representa a adição mínima de cálcio da experiência 1.

6.3 - Resultados

Para uma melhor compreensão e discussão dos resultados foram analisada as duas partes da planta separadamente.

6.3.1 - Resultados parte aérea

6.3.1.1 - Conteúdo de cálcio da parte aérea

O conteúdo de cálcio nos tecidos da parte aérea varia de acordo com a quantidade de cálcio adicionada ao meio de cultura. O Quadro 1 do Anexo VIII, mostra os resultados da análise de variância para o conteúdo de cálcio nos tecidos da parte aérea. A análise dos resultados mostra que houve diferenças significativas para a quantidade de cálcio na parte aérea em função dos seguintes factores: quantidade de cálcio no meio, conteúdo de sacarose e variedade. Também foram encontradas diferenças significativas para o resultado das interacções possíveis entre os três factores mencionados.

Na Figura 6.1 pode-se observar que o conteúdo interno de cálcio na parte aérea foi significativamente diferente entre as variedades, principalmente quando o conteúdo de cálcio no meio foi de 4.5 mM e para os níveis de sacarose de 58.4 mM e sem adição de sacarose.

Verifica-se que Zenith apresenta significativamente mais cálcio que Hypeel no meio que não continha sacarose, e que Hypeel contém mais cálcio quando a adição de sacarose foi de 58.4 mM (dados que confirmam o observado na experiência 1 para este nível de sacarose). Contudo não se verificou diferenças significativas entre as variedades para níveis intermédios de sacarose (29.2 mM).

Analisando-se separadamente cada variedade, pode-se dizer que nos meios com 4.5 mM de cálcio, Zenith reduz significativamente os conteúdos de cálcio nos tecidos da parte aérea a medida que se aumentam as concentrações de sacarose. Para Hypeel os valores de cálcio nos tecidos da parte aérea são mais estáveis, existindo diferenças significativas só entre não adição e 29.2 mM de sacarose (Figura 6.1).

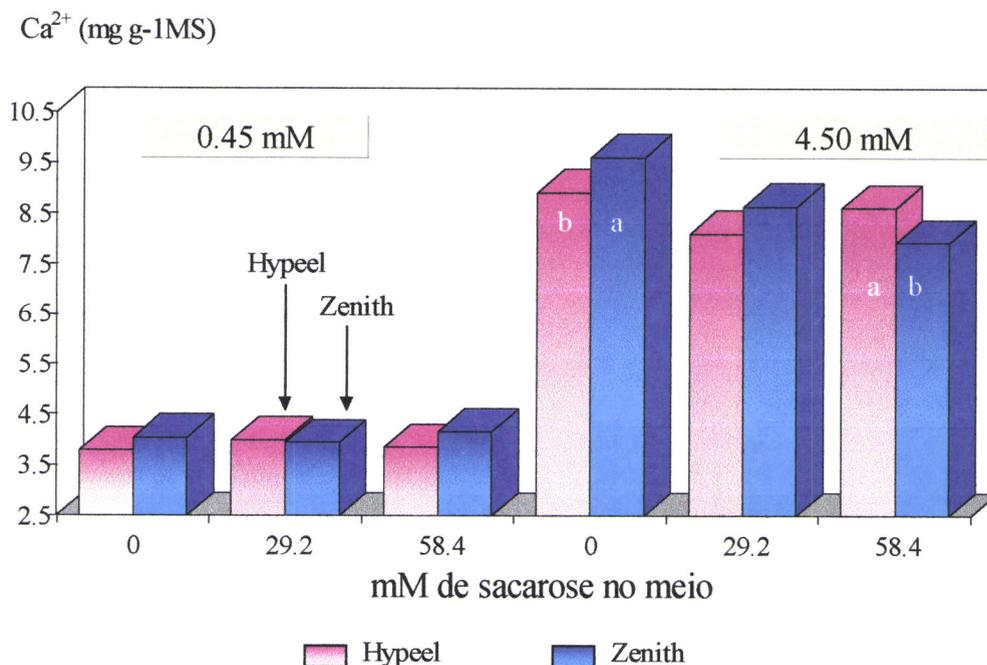


Figura 6.1. Conteúdo de cálcio na parte aérea (mg g⁻¹ MS), para plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith, em função da quantidade de cálcio adicionada no meio (0.45 e 4.5 mM) e de sacarose (sem adição, 29.2 e 58.4 mM). **a, b** diferenças significativas entre as variedades.

Quando as variedades cresceram nos meios que continham 0.45 mM de cálcio, verificou-se que não existiram diferenças significativas no seu conteúdo de cálcio interno para os diferentes níveis de sacarose no meio e nem entre as variedades para todos os tratamentos analisados.

6.3.1.2 - Parâmetros biométricos

Os resultados da análise estatística dos parâmetros biométricos encontram-se transcritos nos Quadros 2 (comprimento da parte aérea), e 3 (matéria seca da parte aérea) do Anexo VIII.

Na Figura 6.2 observa-se que a matéria seca da parte aérea aumentou para os dois níveis de cálcio e nas duas variedades e este aumento foi mais acentuado quanto maior foi o conteúdo de sacarose no meio de cultura. Por outro lado, os valores de matéria seca foram sempre significativamente mais elevados para as plântulas (das duas variedades) que cresceram nos meios com menor concentração de cálcio (0.45 mM). Nestes meios, Zenith apresentou valores de matéria seca significativamente maiores que Hypeel quando não foi adicionado sacarose. Contrariamente, as plantas que cresceram a 4.5 mM de cálcio no meio sem sacarose não apresentaram diferenças entre as variedades.

No que se refere ao comprimento (Fig. 6.2) verifica-se que a adição de sacarose também influenciou o comprimento das plântulas, apresentando estas maior comprimento quanto maior foi o conteúdo de sacarose no meio. Porém os meios com maior conteúdo de cálcio apresentaram uma maior diferença entre os valores de matéria seca e comprimento, o que é indicativo do maior conteúdo em água destas plântulas. A variedade Hypeel foi a que apresentou (como na experiência 1) uma maior diferença entre os valores destes dois parâmetros.

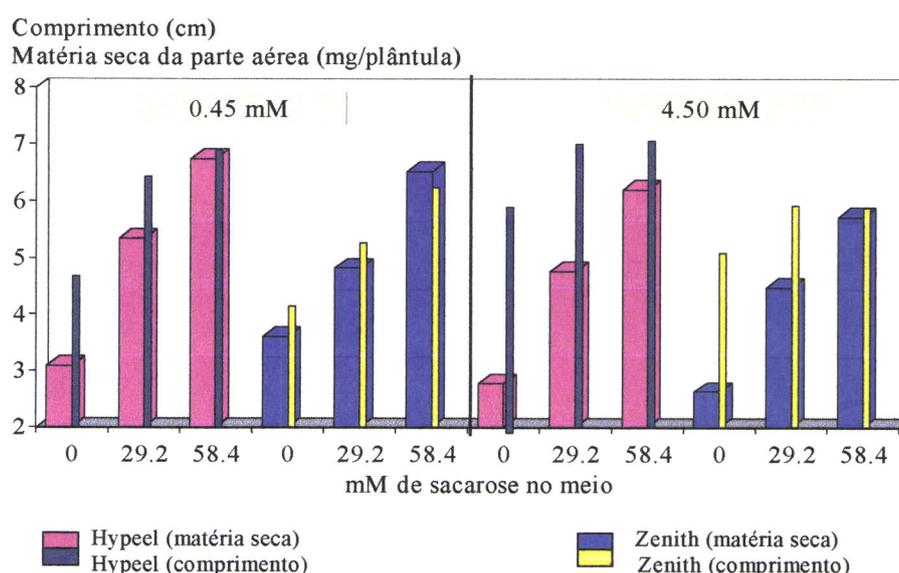


Figura 6.2. Matéria seca e comprimento das plântulas de Hypeel e Zenith em função do conteúdo de cálcio (0.45 e 4.5 mM) e de sacarose no meio (sem adição, 29.2 e 58.4 mM)

Analisando-se as diferenças entre as ose no meio (sem adição, 29.2 e 58.4 mM). variedades pode dizer-se que Hypeel apresentou significativamente maior comprimento que Zenith em todos os tratamentos testados.

No caso de Hypeel não houve diferenças entre os comprimentos das plântulas que cresceram a 4.5 e 0.45 mM de cálcio com 58.4 mM de sacarose. Também não se verificou diferenças entre as plântulas dos tratamentos acima descritos e os que cresceram a 4.5 mM com 29.2 mM de sacarose.

As plantas de Hypeel que cresceram a 4.5 mM de cálcio sem adição de sacarose cresceram tanto quanto as que cresceram a 0.45 mM de cálcio e 29.2 mM de sacarose; porém as plântulas do tratamento com 0.45 mM de cálcio e sem sacarose apresentaram comprimentos menores e significativamente diferentes.

As plantas de Zenith apresentaram um comportamento idêntico as de Hypeel em relação ao comprimento da parte aérea e por tratamento.

Na variedade Zenith e para 4.5 mM não se observou diferenças para o comprimento da parte aérea nos meios com 58.4 mM e 29.2 mM de sacarose. No caso das plantas que cresceram a 0.45 mM de cálcio o comprimento foi significativamente maior quando a quantidade de sacarose no meio foi mais elevada.

6.3.2 - Resultados da raiz

6.3.2.1 - Conteúdo de cálcio

A análise estatística para o conteúdo de cálcio nos tecidos da raiz (Quadro 4 do Anexo VIII), mostra que este variou significativamente em função da quantidade de cálcio adicionada ao meio, em função da quantidade de sacarose no meio e em função das variedades estudadas. Os resultados para as interações entre estes três factores também foram significativos.

Na Figura 6.3 observa-se que, para as duas concentrações de cálcio testadas a quantidade de cálcio interno diminuiu com o aumento de sacarose no meio, tendo os

meios nos quais não fora adicionado sacarose as maiores concentrações de cálcio por grama de matéria seca.

Nos tratamentos com 4.5 mM de cálcio no meio são bem evidentes as diferenças no conteúdo de cálcio nos tecidos da raiz para cada nível de sacarose adicionado; especialmente para a variedade Hypeel. Para esta concentração externa de cálcio esta variedade apresentou menor quantidade de cálcio na raiz quando comparada com Zenith, porém, só foram obtidas diferenças significativas quando as plântulas cresceram em meios com 58.4 mM de sacarose. No caso das plântulas que cresceram em meios com o menor conteúdo de cálcio externo (0.45 mM) as variedades apresentaram diferenças significativas quando não foi adicionada sacarose. As quantidades de Ca^{2+} encontradas nas raízes de Hypeel foram menores que as da variedade Zenith, com exceção das plântulas de Zenith que cresceram em meios com 58.4 mM de sacarose.

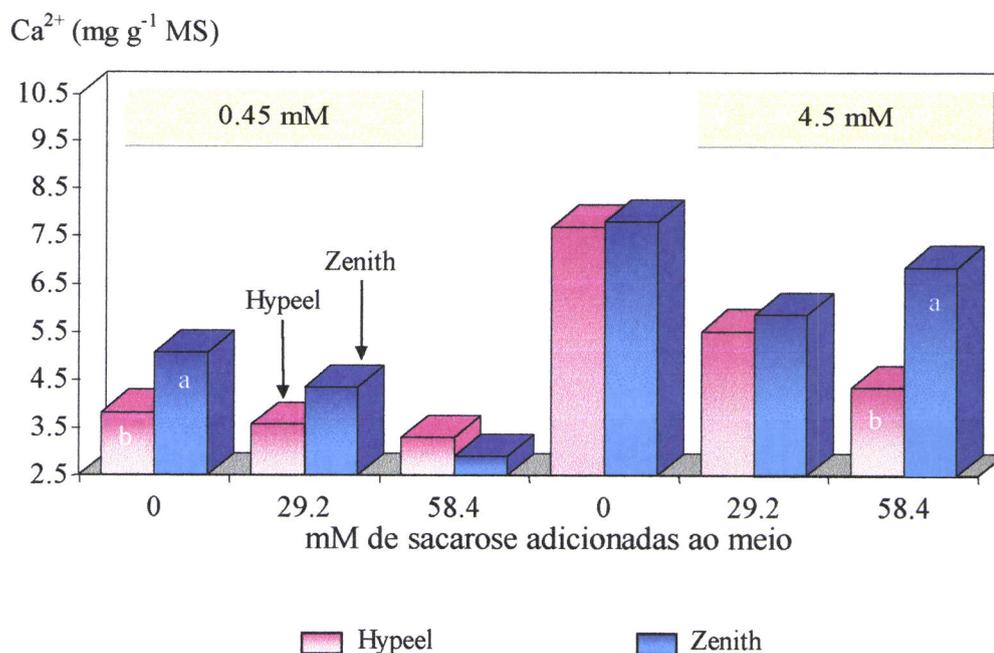


Figura 6.3-Conteúdo de cálcio na raiz (mg g^{-1} MS) para plântulas de 15 dias de Hypeel e Zenith em função das quantidades de cálcio (0.45 e 4.5 mM) e de sacarose (sem adição, 29.2 e 58.4 mM) adicionadas ao meio de cultura. **a, b** diferenças significativas entre as variedades.

De um modo geral, verifica-se que a quantidade de cálcio por grama de matéria seca nos tecidos das raízes foram maiores para Zenith, na maioria dos tratamentos testados, quando comparados com Hypeel. Resultados semelhantes foram obtidos na experiência 1.

6.3.2.2 - Parâmetros biométricos

Os resultados da análise de variância relativa aos parâmetros biométricos das raízes estão representados nos Quadros 5 e 6 do Anexo VIII. Observa-se que o conteúdo de sacarose influenciou tanto o comprimento como a quantidade de matéria seca das raízes, e que as diferentes concentrações de cálcio no meio só afectaram a quantidade de matéria seca mas não o comprimento. Também se verifica que a interacção entre os factores analisados não foi significativa.

Os resultados obtidos mostram que houve diferenças significativas no comprimento das raízes para as interacções cálcio-sacarose e nível de sacarose no meio-variedade. Porém, no que se refere a quantidade de matéria seca das raízes só se observou diferenças significativas para a interacção concentração de cálcio no meio e quantidade de sacarose no meio.

Dos dois parâmetros biométricos analisados, a quantidade de matéria seca das raízes apresentou um padrão semelhante ao observado na parte aérea, isto é a quantidade de matéria seca obtida por ambas as variedades para as duas concentrações de cálcio no meio foi maior quando houve uma elevada disponibilidade de sacarose (Figura 6.4).

Por outro lado as raízes que cresceram a 0.45 mM de cálcio apresentaram valores mais elevados de matéria seca. Todavia não se verificou diferenças significativas entre as variedades quando submetidas ao mesmo tratamento. Analisando-se os valores de comprimento da raiz principal, pode inferir-se que para as duas concentrações de cálcio no meio estes foram:

- a) maiores para as plântulas que cresceram a 29,2 mM de sacarose no meio.

- b) menores para as plântulas de meios com maior concentração de sacarose e
 c) com valores intermédios para as plântulas que cresceram sem sacarose no meio.

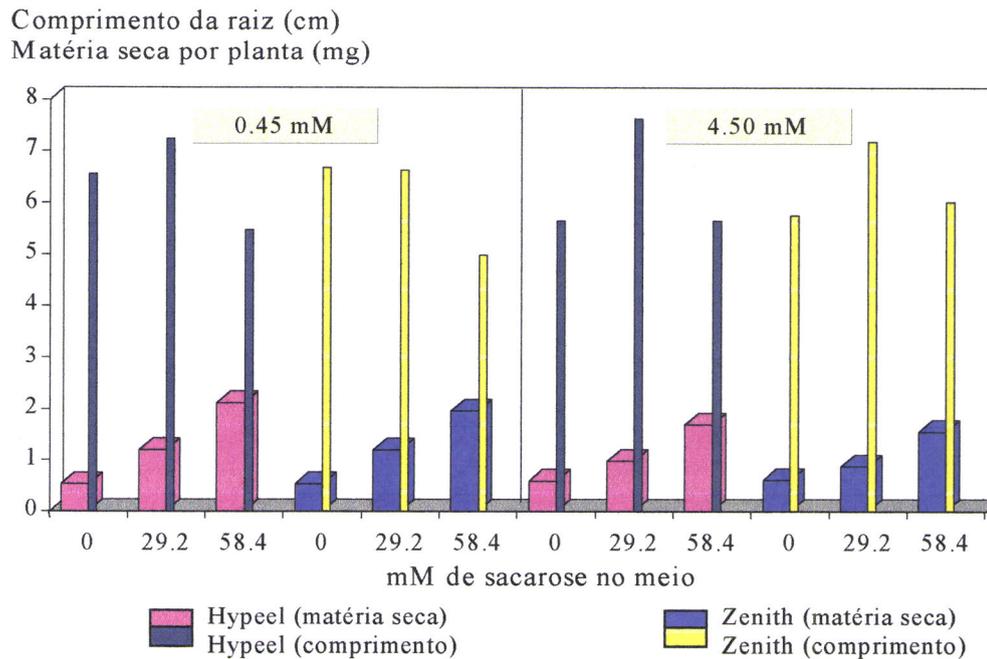


Figura 6.4. Matéria seca e comprimento das plântulas de Hypeel e Zenith em função do conteúdo de cálcio (0.45 e 4.5 mM) e de sacarose no meio (sem adição, 29.2 e 58.4 mM).

6.4 - Discussão dos resultados

6.4.1 - Parte aérea

Para a discussão dos resultados da presente experiência é necessário considerar os seguintes aspectos:

- condição essencialmente mixotrófica no metabolismo dos carboidratos das plantas (com sacarose no meio)
- condição autotrófica no metabolismo dos carboidratos das plantas (sem adição de sacarose no meio),
- diferentes concentrações de cálcio no meio base,
- diferenças no potencial osmótico dos meios, ocasionadas pela concentração de sacarose,

e) efeito dos factores anteriormente descritos na absorção de cálcio e nos parâmetros biométricos das plântulas.

Primeiramente analisar-se-á as modificações apresentadas pelos parâmetros biométricos para uma melhor compreensão dos resultados da absorção de cálcio nas plântulas.

A Figura 6.2 mostra que a um maior conteúdo de carboidratos corresponderam incrementos na quantidade de matéria seca tanto da parte aérea como da raiz. Este resultado reflecte a característica mixotrófica do metabolismo dos carboidratos das plantas cultivadas *in vitro* em meios suplementados com sacarose e nas quais as condições de intensidade luminosa são comparativamente baixas em relação as plantas que crescem ao ar livre.

Estes resultados são coincidentes com os obtidos por Reuter, (1991) em plantas de *Vitis vinifera* e *Pelargonium x hortorum*, cultivadas *in vitro*. Neste trabalho o crescimento destas duas espécies em meios com ágar e 29.2 mM de sacarose (10 g l⁻¹) foi maior que as apresentadas pelas plantas que cresceram em meios com 14.6 mM (5 g l⁻¹), sendo as plantas de menor tamanho aquelas que cresceram em meios sem sacarose. Nas duas espécies citadas o conteúdo em monossacáridos diminuí com a redução da sacarose no meio. Por outro lado, o conteúdo em carboidratos das plantas sem sacarose devia-se à actividade fotossintética (Reuter, 1991).

Os resultados obtidos mostram que os incrementos na produção de matéria seca ocorreram quando se aumentou o conteúdo de sacarose nos dois níveis de cálcio testados. Este resultado demonstra o carácter heterotrófico das plântulas de tomate cultivadas nas condições da experiência. Também se verifica que os baixos valores de matéria seca das plântulas que cresceram sem sacarose são devidos a uma baixa actividade fotossintética, como é de se esperar em plântulas de 15 dias sem desenvolvimento das estruturas foliares.

Contudo para um mesmo valor de sacarose no meio as plantas que cresceram com 0.45 mM de cálcio, apresentaram significativamente um valor mais elevado de

matéria seca que as que cresceram a 4.5 mM, resultados semelhantes aos obtidos na experiência 1.

Os trabalhos de Greger e Bertell (1992) que são dos poucos trabalhos da literatura que relacionam cálcio e carboidratos, nomeadamente os ensaios realizados sobre os efeitos do Ca^{2+} e Cd^{2+} no metabolismo dos carboidratos em beterraba sacarina (*Beta vulgaris*), serviram de referencia na análise e interpretação dos resultados do presente trabalho.

Segundo estes autores na beterraba sacarina o metabolismo dos carboidratos é indirectamente afectado pela presença de cálcio no meio. Este facto foi verificado quando as plantas de beterraba sacarina foram submetidas a três diferentes níveis de cálcio (0.18, 0.72 e 3.65 mM) e apresentaram uma maior concentração de fructose, glucose e sacarose à medida que diminuía a concentração de cálcio no meio. Além disso o peso fresco foi significativamente mais elevado nas plantas com maior conteúdo de cálcio no meio, se bem que a quantidade de matéria seca foi pouco afectada entre os diferentes níveis de cálcio testados (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 - Peso fresco e peso seco de plantas de 5 semanas de beterraba sacarina cultivadas em meio contendo varias concentrações de cálcio.

Tratamento (mM) Ca^{2+}	Peso da planta inteira	
	Peso fresco	Matéria seca
0,18	1.66+/- 0.09	0.130 +/- 0.012
0.72	1.82+/- 0.14	0.130 +/- 0.000
3.65	1.86 +/- 0.18	0.130 +/- 0.003

Os resultados representam as médias de 4 experiências feitas em duplicado; +/- s.e

Fonte: Greger e Bertell (1992).

Comparativamente com estes resultados, os do presente trabalho mostram que:

- a quantidade de matéria seca da parte aérea das plântulas de tomate (das duas variedades) foi menor quanto maior foi o conteúdo de cálcio no meio;
- as diferenças entre a quantidade de matéria seca e o comprimento da parte aérea foi maior a concentrações mais elevadas de cálcio no meio.

Deste modo pode afirmar-se que as plantas que cresceram em baixos níveis de cálcio (0.45mM), apresentaram maior quantidade de matéria seca (para todos os níveis de sacarose testados). Deduz-se assim que, uma maior quantidade de carboidratos foram metabolizados e transformados em matéria seca. Este incremento de matéria seca é explicado por Marschner, (1978) citado por Greger e Bertell, (1992) por um aumento na absorção de carboidratos a baixas quantidades de cálcio no meio. Isto é uma consequência directa da maior permeabilidade das membranas (em meios com baixo conteúdo de cálcio) o que facilita a difusão de solutos ao interior dos tecidos da raiz.

Contudo, os trabalhos realizados por Greger e Bertell, (1992) com beterraba sacarina mostram que o influxo de sacarose nos tecidos das raízes submetidas a baixas concentrações de cálcio, não foi superior ao das outras raízes que cresceram com suprimentos adequados de cálcio. De acordo com estes autores os altos conteúdos de carboidratos verificados nas raízes da beterraba, provavelmente diminuíram o gradiente de sacarose ao nível da membrana e consequentemente do influxo de sacarose nas raízes.

No entanto as raízes de tomate não apresentam tecidos de armazenamento, pelo que existiria um maior gradiente entre a raiz e a parte aérea nas plântulas de tomate em crescimento activo. Assim, a teoria de Marschner, (1978) de que a uma menor concentração de cálcio corresponderia uma maior permeabilidade e portanto um maior influxo de carboidratos, poderia muito bem explicar os altos valores de matéria seca que foi observado na parte aérea das plântulas que cresceram com baixos níveis de cálcio no meio.

Através da análise do comprimento infere-se que as diferenças para uma mesma variedade e entre as plantas que cresceram a 4.5 e 0.45 mM de cálcio com 58.4 mM de sacarose não foi significativa. Porém a quantidade de matéria seca foi significativamente menor nas primeiras (como referido anteriormente): Assim supõe-se que nas primeiras o conteúdo relativo de água nos tecidos foi maior.

Os resultados da medição do tamanho das células do hipocótilo realizado na primeira experiência mostrou que o maior crescimento das plântulas de ambas variedades para 4.5mM de cálcio foi devido a um maior crescimento das células segundo o seu eixo longitudinal e no caso das plântulas que cresceram a 0.45 mM o seu comprimento foi determinado por um maior número de células. Estes resultados confirmam que a quantidade de carboidratos absorvidos e metabolizados foi maior nos meios com pouco cálcio.

Comparando-se as duas variedades em função da quantidade de matéria seca, Hypeel apresentou valores significativamente mais elevados para 4.5 mM de cálcio quando as plântulas estiveram em condição mixotrófica. Não foi observada diferenças significativas entre as variedades quando foram cultivadas sem sacarose, portanto em regime autotrófico. Quando as plântulas cresceram com 0.45 mM de cálcio, os valores de matéria seca das plântulas de Zenith foi superior ao de Hypeel, tanto para os meios com 29.2 mM de sacarose como para os meios sem adição de sacarose.

Analisando-se a quantidade de cálcio nos tecidos da parte aérea, pode-se afirmar que a sua concentração está dependente tanto das quantidades absorvidas pelas raízes como da traslocação que as mesmas fazem para a parte aérea. Por outro lado a absorção de cálcio foi indirectamente influenciada pela quantidade de carboidratos presente no meio de cultura.

6 . 4 . 2 - Raiz

Os conteúdos de cálcio das raízes das duas variedades foi menor quando a quantidade de sacarose no meio foi mais alta.

Na revisão bibliográfica efectuada não se encontraram publicações que correlacionassem estes dois factores na planta com um todo, apesar disso pode-se no entanto inferir que a absorção de cálcio foi indirectamente influenciada pela

quantidade de sacarose e conseqüentemente pela alteração que a sacarose produz nas condições hídricas dos meios.

Como referenciado na literatura, o potencial hídrico é inversamente proporcional a quantidade de solutos dissolvidos no meio, isto significa que a concentrações mais elevadas de sacarose a pressão osmótica é maior e o potencial osmótico apresenta valores cada vez mais negativos. Esta situação é similar as encontradas no solo a medida que este perde água. Assim, em meios de cultura com concentração elevada de sacarose será menor a disponibilidade de água para as plantas que nele crescem.

Por outro lado tendo em consideração a estreita relação entre os suprimentos de água e o movimento xilémico do cálcio na planta e a relativa imobilidade do Ca^{2+} no floema e nos tecidos não vasculares (Banuelos et. al, 1987) pode pensar-se que os altos potenciais osmóticos dos meios com sacarose dificultaram a entrada de água e portanto dos iões nela dissolvidos. Esta ideia estaria de acordo com os maiores conteúdos de cálcio encontrados nas plântulas desta experiência para os meios sem sacarose, esta quantidade decresce a medida que os conteúdos de sacarose aumentam no meio de cultura.

No interior da raiz, o ião cálcio parece seguir preferencialmente a via apoplástica, portanto, o seu transporte esta correlacionado com o da água (Demarty et al., 1983). Deste modo, as raízes que cresceram nos meios sem sacarose incorporaram mais água e mais cálcio e posteriormente transportaram-no para a parte aérea como se pode constatar comparando as Figuras 6.1 e 6.3.

Em relação à ideia acima exposta deve ter-se em consideração o facto das plantas *in vitro* estarem num ambiente quase saturado de humidade, pelo que possuem uma baixa taxa de transpiração. No entanto, Ferguson e Clarkson, (1975) citados por Limami e Lamaze, (1991) afirmam que os movimentos ascendentes dos iões de cálcio ocorrem nos vasos do xilema por pressão radicular quando a transpiração é baixa. Deste modo, poder-se-ia considerar que as plântulas de 15 dias utilizadas neste trabalho, pelo facto de não possuírem folhas desenvolvidas e se

encontrarem num ambiente saturado (tubo de ensaio), apresentaram baixas taxas de transpiração. Sendo assim, a maior parte do cálcio que é absorvido pela raiz seria translocado para a parte aérea devido à disponibilidade de sítios de intercâmbio nas zonas de crescimento e pela pressão radicular.

Analisando-se a distribuição do cálcio para cada nível de sacarose entre as duas partes da plântula verifica-se que em ausência de sacarose as raízes das plantas que cresceram a 0.45 mM apresentaram tanto cálcio como a parte aérea, isto significa que todo cálcio absorvido pela planta foi translocado para a parte aérea.

Por outro lado observa-se que não houve diferenças significativas no conteúdo de cálcio das plântulas que cresceram a 0.45 mM de cálcio independentemente da quantidade de sacarose adicionada, portanto pode concluir-se que neste caso o factor limitante foi a quantidade de cálcio no meio.

Nos resultados obtidos sobre o crescimento das raízes observa-se que as de maior comprimento foram as que cresceram com 29.2 mM de sacarose (total dos dados analisados) seguidas das que cresceram no sistema autotrófico e por fim pelas raízes das plantas cultivadas em 58.4 mM de sacarose que foram as mais pequenas para ambas as variedades.

Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Reuther, (1991) em vinha cultivada *in vitro* cujo maior crescimento radicular foi estimulado em meios com baixas quantidades de sacarose quando comparados com meios de cultura sem adição ou com altas concentrações de sacarose (ver Tabela 5.3).

No presente ensaio a ausência de sacarose teve, como no caso do trabalho de Reuther, (1991) um efeito estimulante no crescimento em comprimento das raízes; se bem que, as raízes das plântulas que cresceram com 29.2 mM de sacarose (10 gramas por litro) apresentaram maior comprimento quando comparadas com as que não tiveram sacarose, conseqüentemente as plântulas que apresentaram menor comprimento da raiz foram as que cresceram com 58.4 mM de sacarose no meio (20 gramas por litro). Por outro lado a diminuição do crescimento em comprimento das raízes que foram cultivadas com baixas concentrações de cálcio pode ser explicado

pelo incremento na pressão osmótica à medida que aumenta o conteúdo de sacarose e com a conseqüente diminuição do potencial hídrico.

Tabela 6.3 - Influência do conteúdo de sacarose no meio de enraizamento, no comprimento das raízes e da parte aérea no cultivar “Riesling” cultivado *in vitro*.

	Riesling				DMS 5%
	20 (g)	10 (g)	5 (g)	0 (g)	
Comprimento raízes	16.5	29.8***	39.5***	33.6***	5.4
Comprimento parte aérea	40.2	39.8	38.7	28.0***	4.4
Matéria seca (%)	8.4	7.0***	7.1**	8.2	0.5

Médias de 30 culturas; avaliação feita dentro das 4 semanas; a avaliação estatística está correlacionada com os 20 g.l⁻¹ como tratamento controlo. Extracto da Tabela publicada por Reuther, 1991.

Em relação à quantidade de matéria seca das raízes, esta foi maior nas raízes que cresceram a 58.4 mM de sacarose (nas duas variedades estudadas), ocasionada principalmente por um maior número de raízes secundárias formadas. Estes resultados confirmam que a um maior conteúdo de carboidratos no meio corresponde um incremento destes principalmente nos tecidos da raiz, cuja utilização será aproximadamente a metade na respiração radical, Lambers et al., (1991) e o restante na produção de uma maior área radicular (crescimento).

No que concerne as diferenças entre as variedades relacionadas com as quantidades de cálcio nos tecidos, pode-se afirmar que:

- em meios com 4.5 mM de cálcio e disponibilidade suficiente de carboidratos a variedade Hypeel translocou para a parte aérea uma maior quantidade de cálcio que Zenith,
- a níveis intermédios (29.2 mM de sacarose) não se verificaram diferenças significativas entre os conteúdos de cálcio das duas variedades,
- para as plântulas que cresceram em condição autotrófica a variedade Zenith translocou maior quantidade de cálcio que Hypeel.

Considerando a quantidade de cálcio das raízes quando se utilizou 4.5 mM de cálcio no meio verifica-se que Hypeel apresentou uma menor quantidade de cálcio nas raízes para 58.4 mM de sacarose. Este resultado mostra que a partição do cálcio

entre a parte aérea e a raiz é diferente entre as variedades (como aliás foi observado na experiência 1), sendo Hypeel mais eficiente na translocação do cálcio para a parte aérea, na presença de suficiente energia. A energia disponível é um aspecto fundamental para esta variedade porque sem sacarose Hypeel apresentou menor quantidade de cálcio na raiz quando comparada com Zenith para 0.45 mM de cálcio no meio. Também não foram observadas diferenças entre as variedades para as quantidades de cálcio na parte aérea (para os níveis de sacarose testados) quando as plantas cresceram com 0.45 mM de cálcio no meio o que demonstra que neste caso o factor limitante foi a quantidade de cálcio no meio.

7 – EXPERIÊNCIA 4

7.1 – Introdução e objectivos

O crescimento e desenvolvimento vegetal estão dependentes da luz para a realização da fotossíntese e dos processos fotomorfogénicos. Estes dois processos são mediados pelos pigmentos que absorvem radiação dum comprimento de onda particular.

A fotossíntese ocorre dentro de comprimentos de onda entre 400 e 700 nm e a luz neste espectro recebe o termo de “radiação fotossinteticamente activa” (*Photosynthetic Active Radiation* - PAR). Porém a fotossíntese realizada pela maioria do material vegetal cultivado *in vitro* é relativamente pequena e as culturas são dependentes de uma fonte externa de carboidratos, portanto é prática corrente na micropropagação usar meios com 2-3% de sacarose.

As plantas cultivadas nestas condições e que utilizam a sacarose como fonte de carbono são capazes de sintetizar clorofila e assimilar CO₂. A combinação do metabolismo heterotrófico e autotrófico contribui para o aprovisionamento de compostos orgânicos carbonados das plantas cultivadas *in vitro*. Esta situação é comparável com as das plântulas cultivadas em condições *ex vitro* que transitam de uma condição heterotrófica a um crescimento autotrófico. Este estágio intermédio é chamado de fotomixotrófico.

Para além das alterações estruturais e do escasso balanço no regime hídrico, a condição de fotomixotrófismo é considerada como outra das causas de perda de plantas micropropagadas quando são transferidas para o solo. Pelos motivos citados, nalgumas espécies cultivadas *in vitro* a estimulação da condição fotoautotrófica é feita reduzindo os níveis de sacarose no meio de cultura.

Por outro lado, e como já anteriormente referido as células vegetais assim como as células de outros organismos regulam a concentração de cálcio livre citoplasmático, esta homeostasia cálcica é um processo dependente de energia e

portanto não será a mesma em plântulas que se encontrem em diferentes regimes de luz (isto significa diferentes taxas fotossintéticas).

Pelo acima exposto, o objectivo desta experiência foi o de testar diferentes níveis de radiação fotossinteticamente activa (PAR) em meios sem sacarose (condição autotrófica) para avaliar-se o efeito que os diferentes níveis de energia teriam na absorção, translocação e distribuição do cálcio nos tecidos da parte aérea e da raiz e sobre os parâmetros biométricos.

7.2 - Material e Métodos

Os materiais e métodos utilizados neste ensaio foram idênticos aos descritos no Capítulo 3 (Material e Métodos). Para se estudar a hipótese proposta não se adicionou sacarose ao meio base de Murashige e Skoog, 1962, portanto as plântulas cresceram totalmente dependentes da fotossíntese (numa situação autotrófica).

As quantidades de cálcio foram modificadas no meio de base, optando-se por testar novamente 0.45 e 4.50 mM de cálcio no meio, deste modo pode-se comparar os resultados deste ensaio com os das experiências anteriormente realizadas. A alteração nas condições físicas das culturas consistiu numa redução das condições da intensidade luminosa a que foram submetidas as plantas durante os 15 dias que nela permaneceram. Não foram modificados nem o fotoperíodo, nem o termoperíodo. A Tabela 7.1, mostra a combinação destes factores por tratamento.

Na câmara de cultura constituídas por 4 prateleiras, cada uma equipada com 4 lâmpadas Philips TDL, 18 W (84), foi colocado um papel opaco para evitar as passagens da luz de uma prateleira para a seguinte. Na prateleira inferior (tratamento controlo) mantiveram-se as 4 lâmpadas acesas durante as horas em que a câmara realizava o fotoperíodo diurno ($77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Na segunda e terceira prateleira mantiveram-se uma e duas lâmpadas respectivamente apagadas durante todo o ensaio, de modo que estas prateleiras tiveram aproximadamente 25 e 50% menos luz que a do tratamento controlo ($54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente).

Em cada prateleira foram postas três repetições (24 tubos cada) de cada variedade e para cada concentração de cálcio (Tabela 7.1). Para assegurar que todas as plântulas de uma mesma prateleira recebessem a mesma quantidade de luz durante o decorrer do ensaio os suportes foram diariamente mudados de posição.

Tabela 7.1 - Conteúdos de cálcio (mM) e de PAR ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), por prateleira (tratamento).

mM de cálcio adicionados	Nível de Radiação Fotossinteticamente Activa $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$		
	77	54	36
0.45	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3
4.5	Trat. 4	Trat. 5	Trat. 6

7.3 - Resultados

7.3.1 - Conteúdo de cálcio nos tecidos

7.3.1.1 - Parte aérea

O conteúdo de cálcio da parte aérea aumentou à medida que a radiação foi menor, esta observação foi verificada para as duas variedades e duas concentrações de cálcio utilizadas no meio.

A análise de variância para o factor cálcio nos tecidos encontra-se no Quadro 1 do Anexo IX. Nas Figuras 7.1a e 7.1b estão representadas as médias das quantidades de cálcio interno para os três níveis de radiação para 0.45 e 4.50 mM de cálcio no meio respectivamente. Nestas Figuras relativas aos intervalos de confiança para os conteúdos de cálcio nos tecidos da parte aérea, pode-se observar que para as duas concentrações de cálcio testadas, os conteúdos de cálcio foram maiores para os níveis mais baixos de radiação. Todavia, não foram encontradas diferenças significativas no conteúdo de cálcio nos tecidos nem entre as variedades nem para o resultado das interações entre o nível de PAR e as variedades, para nenhuma das concentrações de cálcio externo testadas.

Na Tabela 7.2 observar-se que houve efectivamente maior conteúdo de cálcio nos tecidos da parte aérea quando as plantas cresceram a baixos níveis de radiação,

para ambas as variedades e nas duas concentrações de cálcio no meio, no entanto os incrementos percentuais nos conteúdos de cálcio entre 77 e 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram de +120% para Zenith e de +127% para Hypeel nas plântulas que cresceram quando foram adicionados 0.45 mM de cálcio.

Quando comparamos estes resultados com os encontrados quando a adição de cálcio foi de 4.5 mM, vemos que os incrementos foram neste caso muito menores correspondendo um aumento de 33% para Zenith e de 37% para Hypeel entre os níveis extremos de radiação testados.

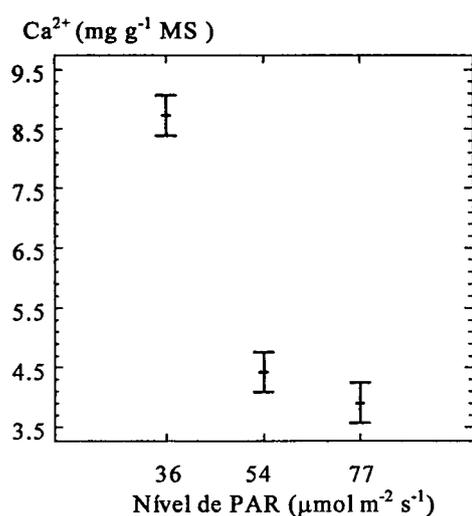


Figura 7.1a- Intervalos de confiança (95% dms) para a quantidade de cálcio nos tecidos da parte aérea ($\text{mg g}^{-1} \text{MS}$) em função da PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para os meios aos que foram adicionados 0.45 mM de cálcio. Médias das duas variedades.

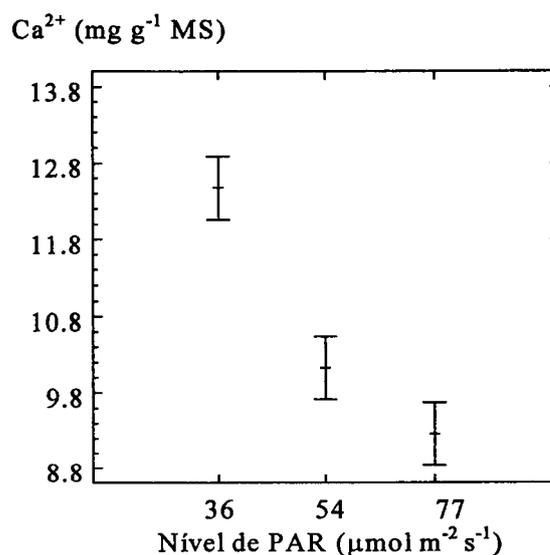


Figura 7.1b- Intervalos de confiança (95% dms) para a quantidade de cálcio nos tecidos da parte aérea ($\text{mg g}^{-1} \text{MS}$) em função da PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para os meios aos que foram adicionados 4.5 mM de cálcio. Médias das duas variedades.

Tabela 7.2 - Cálcio nos tecidos da parte aérea das plântulas das duas variedades em função dos níveis de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de cálcio no meio (mM) e variação percentual de Ca²⁺ entre o nível máximo e mínimo de radiação.

PAR	0.45 mM de cálcio		4.50 mM de cálcio	
	Hypeel	Zenith	Hypeel	Zenith
1 - 77	3.78	4.03	8.9	9.6
2 - 54	4.20	4.65	9.78	10.48
3 - 36	8.58	8.87	12.2	12.75
Δ entre nível 1 e 3	+127%	+127% ⁺	+37% ⁺	+33%

7.3.1.2 - Raiz

Em relação aos conteúdos de cálcio nas raízes das duas variedades estes seguiram as tendências da parte aérea, portanto quanto menor foi a quantidade de radiação fotossintética maior os conteúdos de cálcio nos tecidos da raiz.

No caso das plântulas que cresceram quando foram adicionados 0.45 mM de cálcio no meio, observaram-se diferenças significativas nos conteúdos de cálcio (média das duas variedades) entre os três diferentes níveis de radiação; Figura 7.2a. No entanto e como mostra a Figura 7.2b, quando as plântulas cresceram nos meios com 4.5 mM de cálcio não foram encontradas diferenças significativas entre 54 e 77 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo só significativamente mais elevado o conteúdo de cálcio das plântulas que cresceram à 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação.

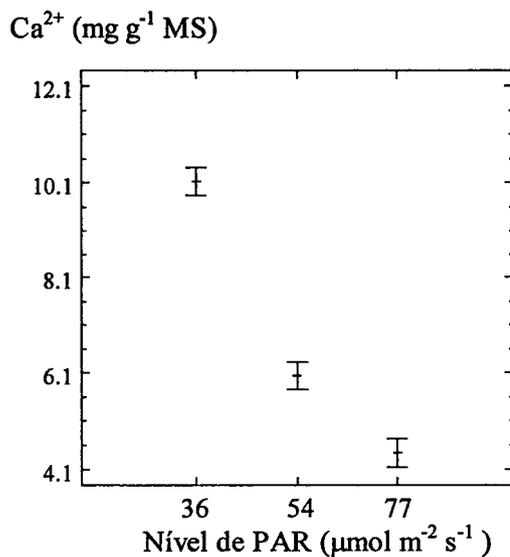


Figura 7.2a-Intervalos de confiança (95% dms) para a quantidade de cálcio nos tecidos da raiz (mg g⁻¹ MS) em função da PAR (μmol m⁻² s⁻¹), para os meios aos que foram adicionados 0.45 mM de cálcio. Médias das duas variedades.

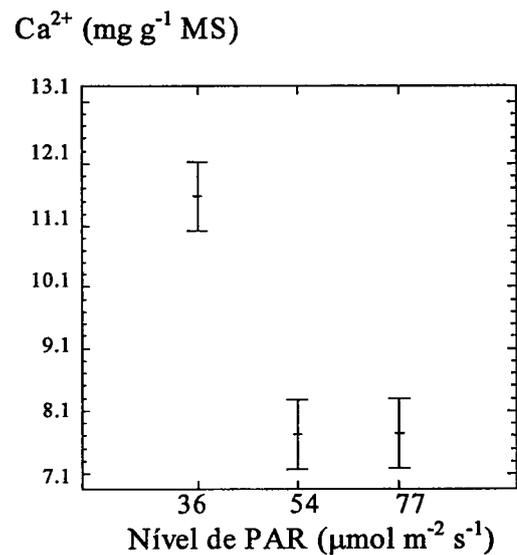


Figura 7.2b-Intervalos de confiança (95% dms) para a quantidade de cálcio nos tecidos da raiz (mg g⁻¹ MS) em função da PAR (μmol m⁻² s⁻¹), para os meios aos que foram adicionados 4.5 mM de cálcio. Médias das duas variedades.

Do mesmo modo, não foram encontradas diferenças significativas entre as variedades nem entre a interação dos níveis de PAR e as variedades quando as plântulas cresceram nos meios com 0.45 mM de cálcio por litro. Contudo as raízes da

variedade Zenith apresentaram significativamente maior quantidade de cálcio que as de Hypeel para 54 e 77 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ quando no meio foram adicionados 4.50 mM de cálcio (Quadro 7 do Anexo IX).

Os dados da Tabela 7.3 mostram que também no caso das raízes as diferenças percentuais entre as quantidades de cálcio interno foram de mais de 100% para as duas variedades entre as plântulas que cresceram no tratamento controlo e aquelas em que a luz foi reduzida num 50%, quando foram adicionados 0.45 mM de cálcio. No caso dos tratamentos com adição de 4.5 mM de cálcio as diferenças entre os tratamentos extremos de PAR foram aproximadamente a metade (+47%, para Hypeel e +52% para Zenith).

Tabela 7.3 - Cálcio nos tecidos da raiz das plântulas das duas variedades em função dos níveis de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de cálcio no meio (mM) e variação percentual de Ca^{2+} entre o nível máximo e mínimo de radiação.

PAR	0.45 mM de cálcio		4.50 mM de cálcio	
	Hypeel	Zenith	Hypeel	Zenith
1 - 77 ¹	3.83	5.07	7.68	7.8
2 - 54 ¹	6.03	6.03	5.77	9.68
3 - 36 ¹	10.08	10.17	11.3	11.87
Δ entre nível 1 e 3	+ 166% ⁺	+ 100%	+47% ⁺	+52%

7.3.2 - Parâmetros biométricos

7.3.2.1 - Comprimento da parte aérea (hipocótilos)

A análise dos parâmetros biométricos permite interpretar os resultados encontrados para os conteúdos de cálcio interno nos tecidos das plântulas para os diferentes níveis de radiação fotossinteticamente activa testado.

As diferenças observadas no comprimento das plântulas das duas variedades na sua totalidade para os diferentes níveis de PAR e conteúdos de cálcio no meio, são apresentados nas Figuras 7.3a (0.45 mM de cálcio) e 7.3b (0.45 mM de cálcio). Nas Figuras observa-se que tanto os níveis de PAR como o nível de cálcio no meio influenciaram o comprimento dos hipocótilos das plântulas das duas variedades.

A análise de variância (Quadros 3 e 4 do Anexo IX) mostra que houve diferenças significativas no comprimento da parte aérea entre as plântulas que cresceram quando foram adicionados 4.50 mM de cálcio no meio quando submetidas aos vários níveis de radiação; apresentando maior comprimento as plântulas que cresceram nos níveis de PAR mais baixos (plantas estioladas).

No entanto, quando as plântulas cresceram nos meios nos que foram adicionados 0.45 mM de cálcio, os níveis de PAR não alteraram significativamente o crescimento da parte aérea, se bem que a tendência observada foi idêntica a das plântulas submetidas a 4.5 mM de cálcio no meio.

As plântulas de Hypeel apresentaram maior comprimento quando comparadas com as de Zenith para 4.5 mM de cálcio no meio e $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR, não havendo diferenças para os outros dois níveis de radiação. Também apresentaram maior comprimento nos meios aos que foram adicionados 0.45 mM de cálcio e que foram submetidos a $77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação.

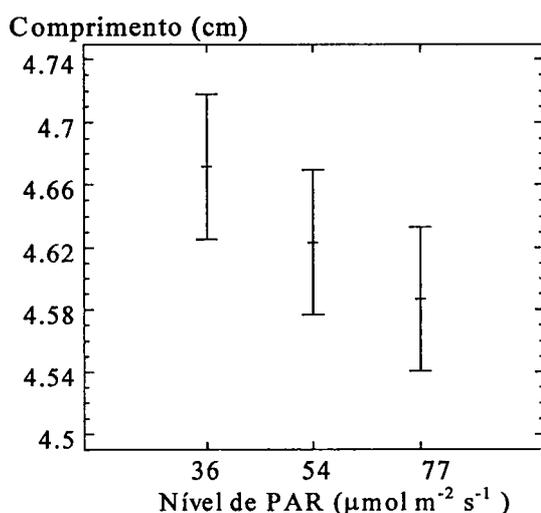


Figura 7.3a-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento (cm) da parte aérea das duas variedades em função do nível de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para os meios aos que foram adicionados 0.45 mM de cálcio. Médias das duas variedades.

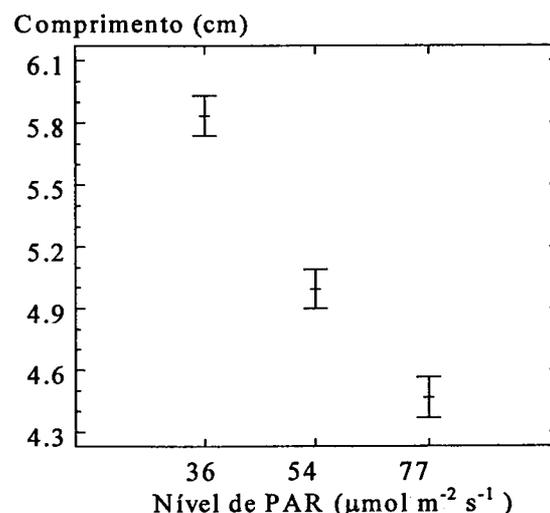


Figura 7.3b-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento (cm) da parte aérea das duas variedades em função do nível de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para os meios aos que foram adicionados 4.5 mM de cálcio. Médias das duas variedades.

As diferenças percentuais entre os comprimentos das plântulas que cresceram nos tratamentos extremos de PAR para as duas concentrações de cálcio no meio encontram-se na Tabela 7.4. Como pode ver-se pelos resultados da Tabela, as plântulas que cresceram com pouca luz e com 0.45 mM de cálcio no meio quase não apresentaram estiolamento (0 e 4% para Hypeel e Zenith respectivamente). Para as plântulas que cresceram com 50% menos de luz comparativamente com o tratamento controlo a diferença para com o tratamento controlo foi de aproximadamente 30% nas duas variedades (plantas estioladas).

Tabela 7.4 - Comprimento da parte aérea das plântulas das duas variedades em função dos níveis de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de cálcio no meio (mM) e variação percentual do comprimento entre o nível máximo e mínimo de radiação.

PAR	0.45 mM de cálcio		4.50 mM de cálcio	
	Hypeel	Zenith	Hypeel	Zenith
1 – 77 ¹	4.7	4.47	4.61	4.32
2 – 54	4.61	4.64	5.07	4.92
3 – 36	4.70	4.65	6.00	5.67
Δ entre nível 1 e 3	0%	+4%	+30%	+31%

7.3.2.2 - Comprimento da raiz

As Figuras 7.4a e 7.4b mostram que o comprimento da raiz principal foi maior quando a PAR foi mais baixa, isto para as duas concentrações de cálcio testadas. No entanto não houve diferenças no comprimento das raízes das plântulas que cresceram a níveis de 45 e 77 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ quando o meio tinha 0.45 mM de cálcio. O comprimento das raízes parece ser menos afectado pela variação da PAR que o comprimento da parte aérea. Os resultados da análise de variância para o comprimento da raiz principal encontram-se transcritos nos Quadros 9 e 10 do Anexo IX.

A variedade Hypeel teve raízes significativamente mais compridas quando comparadas com as raízes da variedade Zenith quando as plântulas cresceram a 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por outro lado o comprimento da raiz principal foi no caso das

plântulas que cresceram a 4.5 mM diferenciam-se significativamente só entre os tratamentos com 50 e 75% de PAR, e estas diferenças deveram-se ao menor crescimento das plântulas da variedade Hypeel.

A Tabela 7.5 mostra os valores de comprimento das raízes das duas variedades para cada tratamento e as respectivas variações percentuais.

Como pode observar-se o parâmetro comprimento da raiz foi, menos afectado pelos níveis de radiação que a parte aérea; no entanto e como aconteceu com a parte aérea, as maiores diferenças no comprimento das raízes verificaram-se nos meios com 0.45 mM de cálcio. Para esta concentração de cálcio, houve um aumento de 25% para Hypeel e de 12% para Zenith entre os tratamentos extremos da radiação.

Quando foram adicionados 4.50 mM de cálcio no meio, os incrementos foram de +3.65 % para Hypeel e de +1.50 % para Zenith a favor do menor nível de radiação.

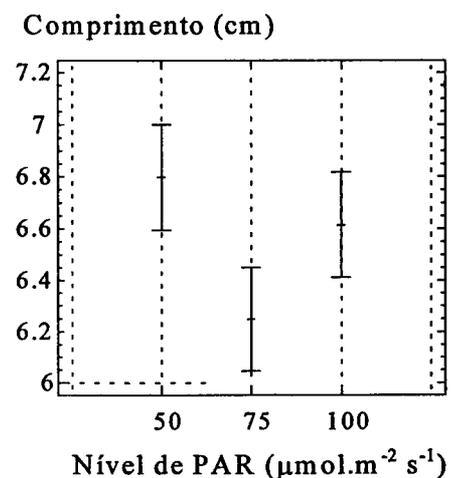
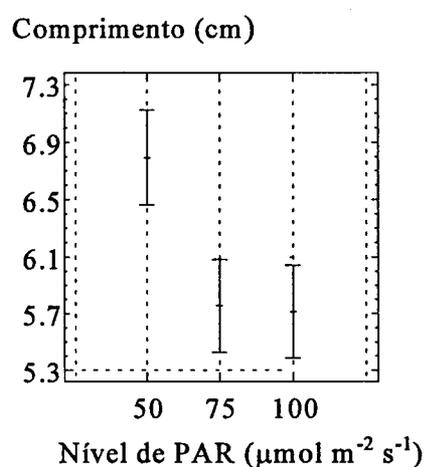


Figura 7.4a-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento da raiz, para as médias dos dados das duas variedades, em função da PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para 0.45 mM de cálcio adicionados ao meio.

Figura 7.4b-Intervalos de confiança (95% dms) para o comprimento da raiz, para as médias dos dados das duas variedades, em função da PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para 4.5 mM de cálcio adicionados ao meio.

Tabela 7.5 - Comprimento da raiz principal em função dos níveis de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de cálcio no meio (mM) e variação percentual do comprimento entre o nível máximo e mínimo de radiação.

PAR	0.45 mM de cálcio		4.50 mM de cálcio	
	Hypeel	Zenith	Hypeel	Zenith
1 - 77	5.66	5.77	6.56	6.67
2 - 54	5.89	5.62	6.38	6.12
3 - 36	7.10	6.47	6.80	6.77
Δ entre nível 1 e 3	+25%	+12%	+3.65%	+1.50%

7.3.2.3 - Matéria seca da parte aérea.

A quantidade de matéria seca da parte aérea das duas variedades foi maior quando a radiação fotossinteticamente activa foi mais elevada. No entanto, a análise de variância (Quadros 5 do Anexo IX) mostra que para uma adição de 0,45 mM de cálcio no meio não existiram diferenças significativas entre as plântulas que cresceram nos diferentes níveis de PAR (Figura 7.5a) e nem para o resultado das interações entre as variedades e nem para as interações entre os níveis de PAR e as variedades.

Para as plântulas que cresceram nos meios com 4.5 mM de cálcio, foram maiores as diferenças observadas entre as quantidades de matéria seca da parte aérea existindo diferenças significativas entre os níveis de PAR e entre as variedades, (Quadros 6 do Anexo IX). Neste caso as plântulas que cresceram a 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram significativamente menor quantidade de matéria seca quando comparadas com as que cresceram a maiores níveis de PAR (Figura 7.5b).

As variedades apresentaram quantidades de matéria seca significativamente diferentes para um mesmo nível de PAR nas duas concentrações de cálcio testados, sendo Hypeel a variedade que teve plântulas com maior quantidade de matéria seca.

Como pode observar-se na Tabela 7.6 este foi o único parâmetro que apresentou uma redução no seu valor a medida que as condições de luz decresceram. Por outro lado os resultados mostram que as variações percentuais entre o nível máximo e

mínimo de radiação foram quase idênticos para uma mesma variedade para as duas concentrações de cálcio testadas.

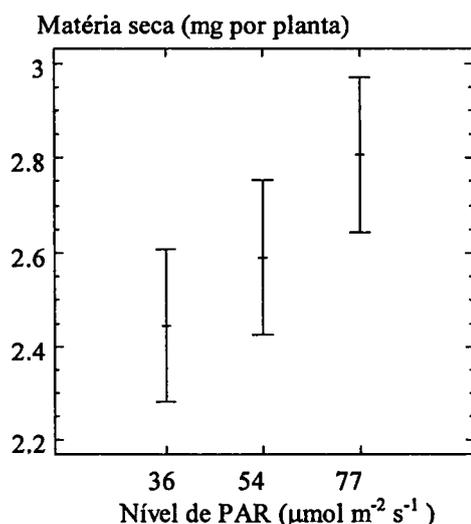


Figura 7.5a. Intervalos de confiança (95% dms) para a matéria seca da parte aérea (mg), em função da PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Meios aos que foram adicionados 0.45 mM de cálcio. Médias das duas variedades.

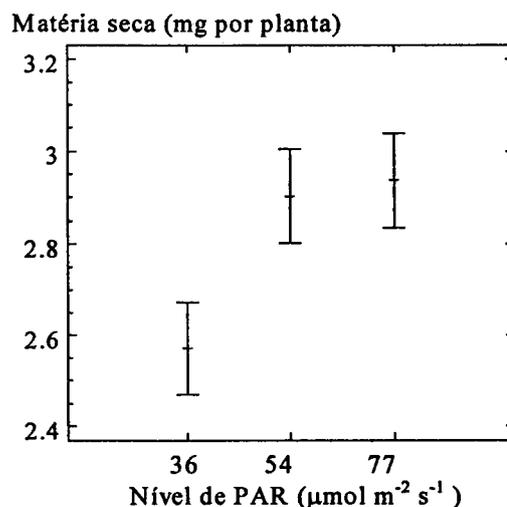


Figura 7.5b. Intervalos de confiança (95% dms) para a matéria seca da parte aérea (mg), em função da PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Meios aos que foram adicionados 4.5 mM de cálcio. Médias das duas variedades.

Tabela 7.6 - Matéria seca da parte aérea das plântulas das duas variedades em função dos níveis de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de cálcio no meio (mM) e variação percentual da matéria seca entre o nível máximo e mínimo de radiação.

PAR	0.45 mM de cálcio		4.50 mM de cálcio	
	Hypeel	Zenith	Hypeel	Zenith
1 - 77	2.89	2.77	3.10	2.77
2 - 54	2.58	2.60	2.97	2.83
3 - 36	2.41	2.48	2.61	2.53
Δ entre nível 1 e 3	-16%	-10%	-16%	-9%

7.3.2.4 - Matéria seca da raiz

Os resultados da análise de variância realizada para o parâmetro matéria seca da raiz (Quadros 11 e 12 do Anexo IX), pode-se concluir que só existiram diferenças na quantidade de matéria seca das raízes entre os níveis de PAR para as plântulas que

criaram com 0.45 mM de cálcio no meio. Neste caso, as plântulas que cresceram com a metade da radiação, comparativamente com a radiação padrão, tiveram significativamente menos peso que as que cresceram nos outros dois níveis de radiação (isto para o conjunto dos dados das duas variedades). Não foram encontradas diferenças entre as variedades nem para o resultado das interações.

Por outro lado não foram observadas diferenças entre as quantidades de matéria seca das raízes das plântulas que cresceram com 4.50 mM de cálcio no meio para nenhum dos factores testados (cálcio no meio, variedades e PAR) e nem para as interações entre eles.

A Tabela 7.7 mostra os resultados nas variações percentuais na matéria seca entre o nível máximo e mínimo de PAR testados. Como pode ver-se pelos resultados a diminuição das condições de radiação afectaram a quantidade de matéria seca da raiz em menor proporção que para a parte aérea, não tendo a quantidade de cálcio no meio quaisquer influência evidente na matéria seca das raízes de ambas as variedades.

Tabela 7.7 - Matéria seca da raiz das plântulas das duas variedades em função dos níveis de PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de cálcio no meio (mM) e variação percentual da matéria seca entre o nível máximo e mínimo de radiação.

PAR	0.45 mM de cálcio		4.50 mM de cálcio	
	Hypeel	Zenith	Hypeel	Zenith
1 - 77	0.60	0.60	0.55	0.53
2 - 54	0.67	0.67	0.53	0.57
3 - 36	2.41	2.48	2.61	2.53
Δ entre nível 1 e 3	-16%	-10%	-16%	-9%

7.4 - Discussão dos resultados

Como pode verificar-se pelos resultados obtidos as quantidades de cálcio na matéria seca da parte aérea foram mais elevadas quando os níveis de PAR foram mais baixos. Este comportamento foi idêntico para as plântulas das duas variedades e concentrações de cálcio testadas, no entanto as diferenças no conteúdo de cálcio nos tecidos foram muito mais evidentes para as que cresceram a 0.45 mM de cálcio no

meio. Sendo este aumento de +116% de cálcio para Hypeel e de +100% de cálcio para Zenith a favor das plântulas que cresceram no menor nível de radiação.

No caso das plântulas que cresceram à 4.5 mM de cálcio os incrementos no conteúdo de cálcio nos tecidos da parte aérea foram de +33% para Hypeel e de +37% para Zenith a favor das plântulas que cresceram à $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a metade dos valores anteriores e foi Zenith que apresentou maiores diferenças.

Os conteúdos de cálcio das raízes seguiram também esta tendência, tendo as raízes de Hypeel +116% de cálcio quando cresceram à $36\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que quando cresceram no nível máximo de radiação, isto para 0.45 mM de cálcio no meio. As raízes de Zenith tiveram +100% de cálcio para as mesmas condições de cultura. As raízes das plântulas que cresceram nos meios com 4.50 mM de cálcio apresentaram maiores quantidades de cálcio nos meios com 50% de radiação comparativamente com a radiação padrão (+47% e mais 52% respectivamente para Hypeel e Zenith).

Os parâmetros biométricos da parte aérea foram afectados tanto pelas quantidades de cálcio presentes no meio de cultura como pelas condições de radiação fotossinteticamente activa.

Como se deduz dos resultados relativos ao comprimento da parte aérea, diminuições progressivas da luz produzem incrementos no comprimento da parte aérea. Este incremento foi da ordem de 30% para ambas as variedades nos meios com 4.5 mM de cálcio o que pode considerar-se como uma típica condição de estiolamento. No entanto não ocorre o mesmo para os meios com 0.45 mM de Ca^{2+} . Nestes meios as plântulas de Hypeel não estiolaram e as de Zenith só foram 4% mais altas à 36 que a $77\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Estes resultados são concordantes com os da experiência 1, em que as plântulas que cresceram com altos conteúdos de Ca^{2+} foram as de maior tamanho devido a uma maior entrada de água na planta. Neste caso a grande diferença de tamanho poderia assim ser explicada por dois factos somados: a falta de radiação e a maior entrada de água na planta como consequência de um maior número e/ou tamanho dos vacúolos que armazenam o excesso de cálcio nas células (facto

discutido na experiência 1).

Uma outra análise dos resultados permite verificar que à diminuições progressivas da luz corresponderam reduções na quantidade de matéria seca da parte aérea, não sendo no entanto evidente o efeito da radiação na matéria seca da raiz. Por outro lado este efeito é evidente só para as plântulas que cresceram com muito cálcio no meio, sendo as que cresceram com pouco cálcio insensíveis as variações da PAR.

Estes resultados poderiam explicar-se pela existência de um limite necessário de cálcio nos tecidos para permitir o alongamento celular (que seria como o cálcio constitutivo da parede) e que 0.45 mM seria uma condição de deficiência de cálcio, como alias foi referido em outras experiências.

Também se pode concluir que níveis diferentes de radiação não produzem o mesmo efeito nas diferentes partes das plântulas quando estas são supridas com diferentes quantidades de cálcio. Neste estudo as plântulas que cresceram à $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ aumentaram o comprimento das suas raízes para o dobro dos valores obtidos para as plântulas que cresceram nos outros níveis de radiação, porem a parte aérea permaneceu com comprimento similar ao das plântulas que cresceram nos outros níveis de PAR, se bem que com um menor valor da matéria seca.

Pelo contrário as plântulas que cresceram também à $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nos meios com 4.5mM de cálcio aumentaram consideravelmente o comprimento da parte aérea (estiolaram) permanecendo a raiz sem alterações evidentes.

Pode-se assim concluir que, no que diz respeito a parte aérea, o baixo nível de cálcio parece limitar o alongamento/e ou divisão celular pelo facto destas plântulas não apresentarem estiolamento numa condição de radiação na qual seria previsível um marcado estiolamento?. Este aspecto necessita um estudo mais aprofundado.

Os níveis de radiação, e a qualidade da mesma modificam o nível interno de homeostásia cálcica?.

8 - CONCLUSÕES

No presente trabalho foi abordado sob um ponto de vista integrado, os efeitos do ião cálcio sobre todas as partes de plântulas de *Lycopersicon esculentum* Mill., salientando as diferenças varietais em relação à afinidade ao cálcio. Deste modo, o principal objectivo do trabalho desenvolvido foi a aplicação de métodos de trabalho conducentes à selecção precoce de genótipos (teste precoce) relacionados com a absorção, transporte e translocação do ião cálcio. Como definido pela AUPELF teste precoce é um teste preditor através do qual se antecipa a expressão fenotípica global, aproximando-se o mais possível da informação genética (genótipo) por intermédio de um factor estreitamente correlacionado (com frequência a resposta é morfológica, fisiológica ou molecular).

A cultura “in vitro” foi a técnica escolhida para a realização dos estudos fisiológicos relacionados com a nutrição cálcica. A escolha desta técnica esteve fundamentalmente relacionada com a grande quantidade de ensaios que são possíveis de realizar num curto espaço de tempo, permitindo deste modo a repetição dos ensaios para aferimento de resultados dispares, pela facilidade e rigor com que podem ser controladas as quantidades dos componentes do meio de cultura (fundamental em estudo de nutrição mineral) e pela diminuição do erro experimental devido as condições ambientais que por outro lado também podem ser facilmente manipuladas

De entre as conclusões que se podem retirar do trabalho, a que parece mais relevante na experiência 1, é o facto da variedade Hypeel (seleccionada para este trabalho pela sua alta resistência à podridão apical em condições de campo) foi a variedade em que se obteve valores de cálcio interno mais elevados para a maioria das condições testadas, apresentando uma alta eficiência de utilização do ião cálcio em condições de baixa disponibilidade no meio de cultura.

No caso da experiência 2 pode-se concluir que as plântulas de tomate comportaram-se como calcícolas utilizando preferencialmente o nitrato. Esta afirmação provém do efeito negativo que se observou com a incorporação de NH_4^+ no meio. Como verificado o NH_4^+ produz sempre um menor crescimento em ambas as variedades. O efeito inibidor do amónio foi menos evidente a medida que foram incrementadas as quantidades de NO_3^- no meio. Uma outra conclusão desta experiência é que a fonte de azoto influenciou não só a quantidade de cálcio absorvida mais particularmente a quantidade de cálcio translocada nas duas variedades. No entanto não alterou a maior afinidade apresentada pela variedade Hypeel.

Na experiência 3 evidenciase a importância que a quantidade de cálcio tem na produção de matéria seca. Assim, baixos níveis de cálcio aumentaram a produção de matéria seca, provavelmente isto é devido ao aumento da permeabilidade das membranas das raízes, facilitando deste modo a difusão dos solutos para interior dos tecidos da raiz. Em relação as quantidades de cálcio absorvidas, pode-se dizer que esta foi indirectamente influenciada pela quantidade de carboidratos presentes no meio de cultura. Com disponibilidade suficiente de carboidratos, Hypeel translocou maior quantidade de cálcio para a parte aérea; a níveis intermédios ambas as variedades translocaram quantidades semelhantes e na condição autotrófica Zenith incorporou e translocou maior quantidade de cálcio que Hypeel.

Na experiência 4 verificou-se que níveis diferentes de radiação não produzem o mesmo efeito nas diferentes partes da plântulas quando estas estão supridas com diferentes quantidades de cálcio. Os parâmetros biométricos da parte aérea são sem dúvida mais influenciados que os da raiz. As quantidades de cálcio na parte aérea e na raiz foram (para uma mesma concentração de cálcio no meio) maiores quando os níveis de PAR foram mais baixos. No entanto a relação entre a homeostasia cálcica e os níveis de radiação não estão suficientemente esclarecidos.

Os parâmetros biométricos analisados (comprimento e matéria seca) foram afectados pela disponibilidade de cálcio no meio. As modificações observadas nestes

parâmetros, induzidos pelas diferentes concentrações de cálcio internas e do meio de cultura são extremamente úteis na interpretação das respostas que um determinado genótipo pode apresentar quando submetido à condições de *stress* nutricional.

Alguns resultados obtidos em relação à biometria celular e conteúdos de cálcio nas diferentes partes da planta fornecem indicação que deverão ser efectuados outros ensaios com a utilização de técnicas mais apropriadas por exemplo: microelctrodos selectivos para medição da concentração de cálcio, microscopia electrónica, etc., para quantificar a concentração de cálcio nos vacúolos e na solução do xilema em plantas submetidas a diferentes concentrações de cálcio no meio.

No presente trabalho é de realçar que a aplicação da técnica da cultura *in vitro* possibilitou estudar os efeitos da concentração de cálcio do meio sobre a planta como um todo (e não apenas a planta como estrutura compartimentalizada como são: órgãos tecidos, células), contribuindo deste modo para um maior conhecimento das estratégias fisiológicas que as variedades adoptaram perante as condições a que foram submetidas.

Porém é necessário ressaltar que alguns estudos complementares poderiam ser realizados nomeadamente no que se refere as alterações da PAR e temperatura relacionados com a absorção de cálcio pelas variedades.

Os resultados obtidos permitem concluir que mediante testes precoces é possível seleccionar variedades em função da sua afinidade pelo cálcio, mostrando esta metodologia (teste precoce) ser de grande utilidade e aplicabilidade em estudos nutricionais, genéticos, e de selecção de genótipos.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, P. e El-Gizawy A. M. 1986. "Effects of salinity and watering level on the calcium contents of tomato fruits". *Acta Horticulturae*. **190**, 253-259.
- Adams, P. e Ho, L. C. 1992. "The susceptibility of modern tomato cultivars to blossom-end rot in relation to salinity". *Journal of Horticultural Science*. **67**, 827-839.
- Askerlund, P. e Evans, D. E. 1992. "Reconstitution and characterisation of a calmodulin-stimulated Ca^{2+} -pumping ATPase purified from *Brassica oleracea*". *Plant Physiol.* **100**, 1670-1681.
- Askerlund, P. e Evans, D. E. 1993. "Detection of distinct phosphorylated intermediates of Ca^{2+} -ATPase and H^{+} -ATPase in plasma membranes from *Brassica oleracea*". *Plant Physiol. Biochem.* **31**, 787-791.
- Atkinson, C. J. 1991a. "The influence of increasing rhizospheric calcium on the ability of *Lupinus luteus* to control water use efficiency". *New Phytol.* **119**, 207-215.
- Atkinson, C. J. 1991b. "The flux and distribution of xylem sap calcium to adaxial and abaxial epidermal tissue in relation to stomatal behaviour". *Journal of Experimental Botany*. **42**, 987-993.
- Atkinson, C. J., Ruiz, L. P., Mansfield, T. A. 1992. "Calcium in xylem sap and the regulation of its delivery to the shoot". *Journal of Experimental Botany*. Vol. 43. **255**, 1315-1324.
- Bagshaw, S. L. e Cleland, R. E. 1993. "Is wall-bound calcium redistributed during the gravireaction of stems and coleoptiles?". *Plant, Cell and Environment*. **16**, 1081-1089.
- Bagshaw, S. L. e Cleland, R. E. 1993. "The effects of enhanced levels of calcium on the gravireaction of sunflower hypocotyls". *Plant, Cell and Environment*. **16**, 1091-1097.
- Bangerth, F. 1979. "Calcium-related physiological disorders of plants". *Annu. Rev. Phytopathol.* **17**, 97-122.
- Bangerth, F., Dilley R. D. e Dewey, D. H. 1972. "Effect of calcium infusion on internal break-down and respiration of apple fruits". *J. Am. Hort. Sci.* **97**, 679-682.

- Banuelos, G. S., Bangerth, F. e Marschner, H. 1987. "Relationship between polar basipetal auxin transport and acropetal Ca transport into tomato fruit. *Physiologia Plantarum*. **71**, 321-327.
- Behling, J. P., Gabelman, W. H. e Gerloff, G. C. 1989. "The distribution and utilisation of calcium by two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) lines differing in calcium efficiency when grown under low-Ca stress". *Plant and Soil*. **113**, 189-196.
- Bell C. W. e Biddulph, O. 1963. "Translocation of calcium". Exchange versus mass flow. *Plant Physiol*. **38**, 610-614.
- Bellow F. E. 1995. "Nitrogen metabolism and crop productivity". Handbook of Plant and Crop Physiology. Mohammad Pessaraki Ed. University of Arizona. Marcel Dekker Inc. pp 275-295.
- Bethke, P. C., Gilroy, S., Russel, L. J. 1995. "Calcium and plant hormones". Davies, P. J. (Ed.), Plant Hormones. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp 298-317
- Braga da Cruz, M. 1990. "L'AMITOM et ses pays membres". Third International Symposium on Processing Tomatoes. *Acta Horticulturae*. **277**, 17-28.
- Brown, M. M. e Ho, L. C. 1993. "Factors affecting calcium transport and basipetal IAA movement in tomato fruit in relation to blossom-end rot". *Journal of Experimental Botany*. Vol. 44, **264**, 1111-1117.
- Bush, D. S. 1995. "Calcium regulation in plant cells and its role in signaling". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **46**. 95-122.
- Caldwell, C. R. e Hang, A. 1981. "Temperature dependence of the barley root plasma-membrane-bound Ca²⁺ and Mg²⁺-dependent ATPase." *Physiol. Plant*. **53**, 117-124.
- Carafoli, E. 1991. "The calcium pumping ATPase of the plasma membrane". *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 531-541.
- Cardoso Ribeiro, J. 1992. "Estudo de variedades de tomateiro para indústria." (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Trabalho de fin de curso. Universidade de Évora. 165 pp.
- Carpita, N., Sabularse, D., Montezinos, D. e Delmer, D. P. 1979. "Determination of the pore size of cell walls of living plant cells". *Science*. **205**, 1144 -1147.
- Cerne, M. 1990. "Different kinds and levels of nitrogen nutrition in tomatoes". *Acta Horticulturae*. **277**, 179-182.

- Chaillou, S., Vessey J. K., Morot-Gaudry J. F., Raper C. D., Henry L. T., Boutin J. P. 1991. "Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium". *J. Exp. Bot.* **42**, 189-196.
- Chapin, F. S. III. 1980. "The mineral nutrition of wild plants". *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **11**, 233-260.
- Clarkson, D. T. e Hanson, J. B. 1980. "The mineral nutrition of plants". *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 239-298.
- Clarkson, D. T. 1984. "Calcium transport between tissues and its distribution in the plant. *Plant, Cell and Environment.* **7**, 449-456.
- Clarkson, D. T. 1988. "Movements of ions across roots". Solute transport in plant cells and tissues. Baker, D. A., Hall, J. L. (Eds). Logman Scientific & Technical. pp 251-304.
- Cleland, R. E. 1987. "The mechanism of wall loosening and wall extension". Physiology of cell expansion during plant growth. Cosgrove, D. J., Knievel, D. P. Eds. American Society of Plant Physiologists. pp 18-27.
- Cleland, R. E., Virk, S. S., Taylor, D. e Bjorkman, T. 1990. "Calcium, cell walls and growth". Calcium in Plant Growth and Development. Leonard, R. T. e Hepler, P. K. (Eds.). The American Society of Plant Physiology, Symposium Series. Vol. 4, pp. 9-16.
- Davies, E. 1987. "Action potentials as multifunctional signals in plants: a unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses". *Plant Cell Environ.* **10**, 623-631.
- De Guzman, C. C. e DeLa Fuente, R. K. 1984. "Polar calcium flux in sunflower hypocotyl segments". *Plant Physiol.* **76**, 347-352.
- Demarty, M., Morvan, C. e Thellier, M. 1984. "Ca²⁺ and the cell wall". *Plant, Cell and Environment.* **7**, 441-448.
- Dumas, Y. 1990. "Mechanisation and input reduction in processing tomato cropping: agronomic aspects; building and testing of appropriate technical ways of management". *Acta Horticulturae.* **277**, 145-152.
- Dumas, Y. 1990. "Tomatoes for processing in 90's : Nutrition and crop fertilisation". *Acta Horticulturae.* **277**, 155-157.
- Eklund, L. e Eliasson, L. 1990. "Effects of calcium ion concentration on the cell wall synthesis". *Journal of Experimental Botany.* Vol. 41. **228**, 863-867.

- Engels, C. e Marschner, H. 1993. "Influence of the form of nitrogen supply on root uptake and translocation of cations in the xylem exudate of maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* **43**, 537-547.
- Epstein, E. 1973. "Mineral Nutrition of Plants": Principles and Perspectives. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Evans, D. E., Briars, S. A. e Williams, L. E. 1991. "Active calcium transport by plant cell membranes". *J. Exp. Bot.* **42**, 285-303.
- Evans, D. E. 1994. "Calmodulin-stimulated calcium pumping ATPases located at the higher plant intracellular membranes: a significant divergence from other eukaryotes?". *Physiologia Plantarum.* **90**, 420-426.
- Felle, H. 1988. "Cytoplasmic free calcium in *Riccia fluitans* L. and *Zea mays* L.: Interaction of Ca^{2+} and pH?". *Planta* **176**, 248-255.
- Ferguson, I. B. e Clarkson, D. T. 1975. "Ion transport and endothermal suberization in the roots of *Zea mays*". *New Phytol.* **75**, 69-79.
- Gamborg, O. L. 1966. "Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. *Can. J. Biochem.* **44**, 791-799.
- Gamborg, O. L. e Eveleigh D. E. 1968. "Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley". *Can. J. Biochem.* **46**, 417-421.
- Gashaw, L. e Mugwira, L. M. 1981. *Agron. J.* **73**, 47.
- Gehring, C. A., Irving, H. R. e Parish, R. W. 1990. "Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 9645-9649.
- Gerendás, J. e Sattelmacher, B. 1990. "Influence of nitrogen form and concentration on growth and ionic balance of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and potato (*Solanum tuberosum*)". Plant Nutrition-Physiology and Application. Beusichen, M. L. (Ed.). Kluwer Academic, Dordrech. pp. 33-37.
- Greger, M. e Bertell, G. 1992. "Effects of Ca^{2+} and Cd^{2+} on the carbohydrate metabolism in sugar beet (*Beta vulgaris*)". *Journal of Experimental Botany.* Vol. **43**. **247**, 167-173.
- Gutschick, V. P. 1993. "Nutrient-limited growth rates: roles of nutrient-use efficiency and of adaptations to increase uptake rates". *J. Exp. Bot.* **44**, 41-52.

- Heller, R. 1955. "Les besoins minéraux des tissus en culture". *La Physiologie des Cultures de Tissus végétaux*. Union Internationale des Sciences Biol. Séries B (Colloques) 20. pp. 1-21.
- Heller, R., Esnault, R. e Lance, C. 1989. *Physiologie Végétale*. 1. Nutrition. Masson, Paris.
- Hepler, P. K. e Wayne, R. O. 1985. "Calcium and plant development". *Ann. Ver. Plant Physiol.* **36**, 397-439.
- Hertel, R. 1983. "Mechanism of auxin transport as a model for auxin action" *Z. Pflanzenphysiol.* **112**, 53-67.
- Ho, L. C., Belda R., Brown, M. Andrews, J. e Adams, P. 1993. "Uptake and transport of calcium and the possible causes of blossom-end rot in tomato". *Journal of Experimental Botany*, Vol. 44, **259**, 509-518.
- Hocking, P. J. 1980b. "The composition of the phloem exudate and xylem sap from tree tobacco (*Nicotiana glauca* Groh.)". *Ann Bot.* (London). **45**, 633-643.
- Hope, A. B. e Stevens, P. G. 1952. "Electrical potential differences in bean roots on their relation to salt uptake". *Aust. J. Sci. Res. Ser. B* **5**, 335-343.
- Kauss, H. 1987. "Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism". *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38**, 47-72.
- Kuiper, D. e Kuiper, P. J. C. 1979. " Ca^{2+} and Mg^{2+} stimulated ATPases from roots of *Plantago lanceolata*, *Plantago media* e *Plantago coronopus*: Response to alterations of the level of mineral nutrition and ecological significance". *Physiol. Plant.* **45**, 240-244.
- Lauchli, A. 1976b. "Genotypic variation in transport". *Transport in Plants* 2. Part A. Luttge, A. e Pitman, M.G. Eds. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 372-393.
- Limami, A. e Lamaze, T. 1991. "Calcium (^{45}Ca) accumulation and transport in chicory (*Cichorium intybus* L.) root during bud development (forcing)". *Plant and Soil.* **130**, 000-000. Kluwer Academic Publishers.
- Loneragan, J. F. e Snowball, K. 1969. "Calcium requirements of plants". *Australian Journal of Agricultural Research.* **20**, 465-478.
- Marmé, D. 1983. "Calcium transport and function". *Inorganic Plant Nutrition. Encyclopedia of Plant Physiology* (NS), Ed. A. Lauchli, R. L. Bielski, 15B, 599-625. Springer-Verlag.

- Marschner, H. 1978. "Nutritional and yield physiological aspects of plant nutrition". *Angewandte Botanik*. **52**, 71-87.
- Marschner, H. 1986. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. Academic Press, London.
- Matsumoto, H. e Taraoka, K. 1980. "Accumulation of sugars in cucumber leaves during calcium starvation. *Plant and Cell Physiology*. **21**, 1505-1513.
- Mc Ainch, M. R., Brownlee, M. R., Hetherington, A. M. 1990. Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. *Nature*. **343**, 186-188.
- Meierrose, A. C. 1990. Luta biológica contra *Heloithis armigera* no ecossistema agrícola "tomate para indústria", interações cultura-fitófagos-antagonistas. Tese de Doutoramento em Entomologia. Universidade de Évora. 356 pp.
- Mengel, K. e Kirkby E. A. 1982. "Principles of Plant Nutrition". 3rd Ed. International Potash Institut, Bern, Switzerland. Pp 444-459.
- Moll, C. e Jones, R. L. 1981. "Calcium and GA-induced stem elongation of lettuce hypocotyl sections". *Planta*. **152**, 450-456.
- Moncousin, Ch. 1991. "Influence of gelling agent and carbon source on the in vitro proliferation rate of apple rootstock EM IX". *Acta Horticulturae*. **289**, 157-159.
- Morel, G. 1950. "Sur la culture des tissus de deux Monocotylédones". *Comp. Rend. Acad. Sci.*, Paris. **230**, 1099-1101.
- Murashige, T. e Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant*. **15**, 473-497.
- Pourrat, Y. e Dutuit, P. 1993. "Effects of the sodium and calcium concentration on the in vitro growth of *Atriplex halimus* L. plantlets". *Journal of Plant Nutrition*. **16** (8), 1417-1429.
- Ramon, M., David, T e Clarkson, D. T. 1993. "Calcium transport across plasma membrane vesicles isolated from shoots of *Stellaria media* and *Avena sativa*". *Physiologia Plantarum*. **89**, 731-740.
- Rasmussen, H. e Barret, P. Q. 1984. "Calcium messenger system: integrated view". *Physiol. Rev*. **64**, 938-984.

- Raven, J. A. 1977. "H⁺ and Ca²⁺ in phloem and symplast: relation of relative immobility of the ions to the cytoplasmic natures of the transport path". *New Phytol.* **79** 465-480.
- Raven, J. A. 1985. "Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular land plants. Cost and benefits in relation to efficiency of use of water". *New Phytol.* **101**, 25-77.
- Rayle, D. 1989. "Calcium bridges are not load-bearing cell-wall bonds in *Avena* coleoptiles". *Planta.* **178**, 92-95.
- Reddy, A. S. N. 1995. "Calcium as a messenger in stress signal transduction": Pessaraki, M. Handbook of Plant and Crop Physiology. Dekker, New York. Pp 719-729.
- Reuther, G. 1991. "Stimulation of the photoautotrophy of *in vitro* plants". *Acta Horticulturae.* **300**, 59-68.
- Roberts, D. M. e Harmon, A. C. 1992. " Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 375-414.
- Roux, S. L. 1994. "Signal transduction in phytochrome responses". R. E. Kendrick e G. H. M Kronenberg (Eds.). Photomorphogenesis in plants- 2nd Ed. Kluwer Academic Publishers. pp 187-209.
- Salsac, L., Chaillou, S., Morot-Gaudry, J. F., Lesaint, C. e Jolivet E. 1987. "Nitrate and ammonium nutrition in plants". *Plant Physiol. Biochem.* **25**, 805-812.
- Saviv, A. Hagin, J. e Newmann, P. M. 1978. "Effects of a nitrification inhibitor on efficiency of nitrogen utilisation by wheat and millet". *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* **18**, 815-833.
- Schulte-Baukloh, C. e Fromm, J. 1993. "The effect of calcium starvation on assimilate partitioning and mineral distribution of the phloem". *Journal of Experimental Botany.* Vol. 44. **268**, 1703-1707.
- Schumaker, K. S. e Sze, H. 1986. "Calcium transport into the vacuole of oat roots". *J. Biol. Chem.* **261**, 12172-12178.
- Shear, C. B. 1975. "Calcium related disorders of fruits and vegetables". *HortScience.* **10**, 361-365.
- Tachibana, S. 1991. "Import of calcium by tomato fruit in relation to the day-night periodicity". *Sci. Hortic.* **45**, 235-243.

- Tamas, I. A. 1995. "Hormonal regulation of apical dominance". *Plant Hormones*. Davies, P. J. (Ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp 572-597.
- Tsai, C. Y., Huber, D. M. e Warren H. L. 1980. *Plant Physiol.* 66, 330.
- Van Beucsichen, M. L., Kirby, E. A. e Bass, R. 1988. "Influence of nitrate and ammonium nutrition and the uptake, assimilation and distribution of nutrients in *Ricinus communis*". *Plant physiol.* 86, 914-921.
- Vicente, J. A. F. e Graça, P. V. 1995. "Activities of Ca^{2+} pump and low affinity $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiport in plasma membrane vesicles of corn roots". *Journal of Experimental Botany*. Vol. 46. 291, 1551-1559.
- Virk, S. S. e Cleland, R. E. 1988. "Calcium and the mechanical properties of soybean hypocotyl cell walls: Possible role of calcium and protons in cell-wall loosening". *Planta.* 176, 60-67.
- Virk, S. S. e Cleland, R. E. 1990. "The role of wall calcium in the extension of cell walls of soybean hypocotyls". *Planta.* 182, 559-564.
- Xu, Q. F., Tsai, C. L. e Tsai, C. Y. 1992. "Interaction of potassium with the form and amount of nitrogen nutrition on growth and nitrogen uptake of maize". *J. Plant Nutr.* 15, 23-33.

ANEXO I

Meio de Murashige e Skoog
(1962)

MACRONUTRIENTES

	Solução Mãe [X 10] (mg/l)	mg/l
NH_4NO_3	16 500	1 650
NO_3K	19 000	1 900
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4 400	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 700	370
KH_2PO_4	1 700	170

Usar 100 ml da solução mãe [X10] para preparar 1 litro de meio

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Na_2EDTA	37,3

MICRONUTRIENTES

	Solução Mãe [X 100] (mg/l)	mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2 230	22,3
HBO_3	620	6,2
KI	83	0,83
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860	8,6
$\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5	25 μg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25	250 μg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5	250 μg

Usar 10 ml da solução mãe [X10] para preparar 1 litro de meio

ANEXO II

Vitaminas de Morel (1950)

	Para 100 ml de Solução Mãe [X 500]	
	(mg/l)	µg/l
Pantotenato de cálcio	50	1 000
Mio-inositol	5 000	100 mg/l
Biotina	usar 1ml da solução*	10
Ac. Nicotínico (Vit. PP)	50	1 000
Piridoxina . HCl (Vit. B₆)	50	1 000
Tiamina . HCl (Vit. B₁)	50	1 000

Usar 2 ml da solução mãe [X500] para 1 litro de meio
--

*Solução de Biotina

Para uma solução 5×10^{-4} :

Dissolver 50 mg de biotina em 100 ml de álcool 95%. Retirar 1ml desta solução e adicionar aos 99 ml do resto da solução vitamínica para obter 100 ml da solução mãe de Morel.

Os 100 ml da solução mãe devem ser guardados no frigorífico (congelados) em pequenos frascos de 10 ml. Quando for a utilizar deve descongelar-se durante a noite à temperatura ambiente.

ANEXO III
Tabela de registo de dados nº 3
(Comprimento)

Experiência:

Variedade:

Meio:

Data: / /

Tubo nº	Rep. 1		Rep.2		Rep. 3	
	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
13						
24						
Média rep.						

Média parte aérea:

Média raiz:

ANEXO IV

Tabela de registo de dados nº 2

(Matéria seca)

Experiência:

Data: / /

Meio:

Variedade:

Rep.	C. Petri + parte aérea	C. Petri	Peso seco parte aérea	C. Petri + Peso raiz	C. Petri	Peso seco raiz
1						
2						
3						

Pesos secos médios/plântula/repetição.

Rep.	Nº de plantas por repetição	Peso seco parte aérea (mg)	Peso seco raiz (mg)
1			
2			
3			

Meio:

Variedade:

	C. Petri + parte aérea	C. Petri	Rep.	C. Petri + Peso raiz	C. Petri	Peso seco raiz
1						
2						
3						

Pesos secos médios/plântula/repetição.

Rep.	Nº de plantas por repetição	Peso seco parte aérea (mg)	Peso seco raiz (mg)
1			
2			
3			

Meio:

Variedade:

Rep.	C. Petri + parte aérea	C. Petri	Peso seco parte aérea	C. Petri + Peso raiz	C. Petri	Peso seco raiz
1						
2						
3						

Pesos secos médios/plântula/repetição.

Rep.	Nº de plantas por repetição	Peso seco parte aérea (mg)	Peso seco raiz (mg)
1			
2			
3			

ANEXO V

Tabela de registo de dados nº 3
(Ca²⁺)

Experiência:

Data: / /

Meio:

Variedade:

	Parte aérea			Raiz		
	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Diluição						
Valor X (*)						
Mat. seca amostra (mg) ®						
ml de HCl (♦)						
ppm extracto						
ppm amostra						
mg Ca ²⁺ /g de mat. seca						
mg Ca ²⁺ /g de mat. seca parte aérea, valor médio =						
mg Ca ²⁺ /g de mat. seca raiz, valor médio =						

Meio:

Variedade:

	Parte aérea			Raiz		
	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.1	Rep.2	Rep.3
Diluição						
Valor X (*)						
Mat. seca amostra (mg) ®						
ml de HCl (♦)						
ppm extracto						
ppm amostra						
mg Ca ²⁺ /g de mat. seca						
mg Ca ²⁺ /g de mat. seca parte aérea, valor médio =						
mg Ca ²⁺ /g de mat. seca raiz, valor médio =						

ANEXO VI

Análise de variância da experiência 1

(Parte aérea)

Quadro 1-Análise de variância, variável cálcio. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	8	1845.5762	230.6970	396.582	0.0000**
B: Variedades	1	17.3967	17.3967	29.906	0.0000**
Interacções					
AB	8	107.5895	13.4487	23.119	0.0000**
RESÍDUOS	36	20.9416	0.5817		
TOTAL (Corrigido)	53	1991.5041			

Todos os F são baseados no erro da média residual dos quadrados.

* valores significativos, ** valores altamente significativos

Quadro 2-Análise de variância, variável comprimento. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	8	12.0679	1.5084	12.582	0.0000**
B: Variedades	1	7.9503	7.9503	66.314	0.0000**
Interacções					
AB	8	1.9579	0.2447	2.051	0.0690
RESÍDUOS	36	4.3160	0.1198		
TOTAL (Corrigido)	53	26.2921			

Quadro 3 - Análise de variância, variável matéria seca. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	8	19.4197	2.4274	7.026	0.0000**
B: Variedades	1	32.2634		93.385	0.0000**
Interacções					
AB	8	2.3385	0.2923	0.846	0.5692
RESÍDUOS	36	12.4376	0.3454		
TOTAL (Corrigido)	53	66.4594			

(Raiz)**Quadro 4-Análise de variância, variável cálcio. Soma Quadrados Tipo III**

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	8	238.9812	29.8726	37.375	0.0000**
B: Variedades	1	1.5019	1.5019	1.879	0.1792
Interacções					
AB	8	46.4535	5.8066	7.267	0.0000**
RESÍDUOS	35	27.9747	0.7992		
TOTAL (Corrigido)	53	315.5251			

Quadro 5-Análise de variância, variável comprimento. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	8	0.9560	0.1195	4.565	0.0007*
B: Variedades	1	0.2787	0.2787	10.650	0.0024*
Interacções					
AB	8	0.2631	0.03289	1.257	0.2963
RESÍDUOS	36	0.9424	0.0261		
TOTAL (Corrigido)	53	2.4404			

Quadro 6-Análise de variância, variável matéria seca. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	8	4.0175	0.5021	9.578	0.0000**
B: Variedades	1	0.7704	0.7704	14.698	0.0005**
Interacções					
AB	8	0.6044	0.0755	1.441	0.2134
RESÍDUOS	36	1.8874	0.0524		
TOTAL (Corrigido)	53	7.2798			

Quadro 7-Análise de variância, variável tamanho das células. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	1	6.4108	6.4108	381.429	0.0000**
B: Variedades	1	1.3461	1.3461	80.094	0.0000**
Interacções					
AB	1	1.1648	1.1648	6.930	0.0087*
RESÍDUOS	596	0.0010	1.6807		
TOTAL (Corrigido)	599	0.0017			

ANEXO VII

Análise de variância da experiência 2

(Parte aérea)

Quadro 1-Análise de variância para a variável cálcio. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	4	223.6007	55.9002	281.790	0.0000**
B:Fontes de Azoto	1	234.8282	234.8282	1183.759	0.0000**
C: Variedade	1	23.6882	23.6882	119.411	0.0000**
Interacções					
AB	4	7.7302	1.9325	9.742	0.0000**
AC	4	14.2218	3.5555	17.923	0.0000**
BC	1	4.8735	4.8735	24.567	0.0000**
ABC	4	2.3490	0.5872	2.960	0.0311*
RESÍDUOS	40	7.9350	0.1984		
TOTAL (Corrigido)	59	519.2265			

Todos os F são baseados no erro da média residual dos quadrados

* valores significativos, ** valores altamente significativos.

Quadro 2-Análise de variância, variável comprimento. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	4	21.3543	5.3386	19.970	0.0000**
B:Fontes de Azoto	1	61.3879	61.3879	229.632	0.0000**
C: Variedade	1	1.0270	1.0270	3.842	0.0570
Interacções					
AB	4	3.1111	0.7777	2.909	0.0333*
AC	4	2.2133	0.5533	2.070	0.1029
BC	1	0.0421	0.0421	0.158	0.6977
ABC	4	0.8988	0.2247	0.841	0.5078
RESÍDUOS	40	10.6933	0.2673		
TOTAL (Corrigido)	59	100.7278			

Quadro 3-Análise de variância, variável matéria seca. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	4	25.5370	6.3842	28.481	0.0000**
B:Fontes de Azoto	1	78.1585	78.1585	348.670	0.0000**
C: Variedade	1	2.4888	2.4888	11.103	0.0019*
Interacções					
AB	4	2.3295	0.5824	2.598	0.0505
AC	4	1.0714	0.2678	1.195	0.3279
BC	1	0.0516	0.0516	0.230	0.6390
ABC	4	0.4760	0.1190	0.531	0.7137
RESÍDUOS	40	8.9665	0.2242		
TOTAL (Corrigido)	59	119.0793			

Quadro 4. Análise de variância para a variável cálcio. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	4	88.9878	22.2469	63.623	0.0000**
B:Fontes de Azoto	1	3.4800	3.4800	9.952	0.0030*
C: Variedade	1	2.9704	2.9704	8.495	0.0058*
Interacções					
AB	4	3.5814	0.8954	2.561	0.0531
AC	4	7.4736	1.8684	5.343	0.0015*
BC	1	0.1760	0.1760	0.503	0.4896
ABC	4	0.8513	0.2128	0.609	0.6588
RESÍDUOS	40	13.9867	0.3497		
TOTAL (Corrigido)	59	121.5071			

Quadro 5. Análise de variância para a variável comprimento. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	4	0.5396	0.1349	3.903	0.0091*
B:Fontes de Azoto	1	0.3110	0.3110	8.999	0.0046*
C: Variedade	1	0.1771	0.1771	5.125	0.0291*
Interacções					
AB	4	0.4023	0.1006	2.910	0.0333*
AC	4	0.2223	0.0556	1.608	0.1911
BC	1	0.0505	0.0505	1.460	0.2340
ABC	4	0.3096	0.0774	2.240	0.0819
RESÍDUOS	40	1.3825	0.0346		
TOTAL (Corrigido)	59	3.3950			

Quadro 6. Análise de variância para a variável matéria seca. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	4	2.6808	0.6702	14.232	0.0000**
B:Fontes de Azoto	1	16.8858	16.8858	358.573	0.0000**
C: Variedade	1	0.02948	0.0295	0.626	0.4419
Interacções					
AB	4	0.5901	0.1475	3.133	0.0248*
AC	4	0.3597	0.0899	1.910	0.1276
BC	1	0.2100	0.2100	4.460	0.0410*
ABC	4	0.0888	0.0222	0.471	0.7566
RESÍDUOS	40	1.8837	0.0471		
TOTAL (Corrigido)	59	22.7285			

Quadro 7-Análise de variância para a variável razão raiz/hipocótilo. Soma Quadrados Tipo III

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Meios	4	0.1713	0.0428	16.793	0.0000**
B:Fontes de Azoto	1	0.3692	0.3692	144.781	0.0000**
C: Variedade	1	0.0111	0.0111	4.340	0.0438*
Interacções					
AB	4	0.0369	0.0092	3.614	0.0134*
AC	4	0.0429	0.0107	4.201	0.0063*
BC	1	0.0007	0.0007	0.268	0.6131
ABC	4	0.0114	0.0029	1.118	0.3618
RESÍDUOS	39	0.0995	0.0026		
TOTAL (Corrigido)	58	0.7236			

Todos os F são baseados no erro da média residual dos quadrados

1 valor perdido foi excluído.

* valores significativos

** valores altamente significativos

ANEXO VIII

Análise de variância da experiência 3

(Parte aérea)

Quadro 1-Análise de variância para a variável cálcio no hipocótilo. Soma Quadrados Tipo III.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Cálcio no meio	1	196.56040	196.56040	1389.010	0.0000**
B: Sacarose no meio	2	1.52627	0.76314	5.393	0.0116*
C: Variedade	1	0.26351	0.26351	1.862	0.1850
Interações					
AB	2	2.1145500	1.0572750	7.471	0.0030*
AB	1	0.0004000	0.0004000	0.003	0.9586
BC	2	0.6659389	0.3329694	2.353	0.1166
ABC	2	1.1252167	0.5626083	3.976	0.0323*
RESÍDUOS	24	3.3962667	0.1415111		
TOTAL (Corrigido)	35	205.65256			

Todos os F são baseados no erro da média residual dos quadrados. * Valores significativos; ** valores altamente significativos

Quadro 2-Análise de variância para a variável comprimento. Soma dos Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Cálcio no meio	1	2.7666778	2.7666778	28.986	0.0000**
B: Sacarose no meio	2	15.355839	7.6779194	80.439	0.0000**
C: Variedade	1	7.599211	7.5992111	79.615	0.0000**
Interações					
AB	2	2.2693056	1.1346528	11.887	0.0003**
AC	1	0.1708444	0.1708444	1.790	0.1935
BC	2	0.2285056	0.1142528	1.197	0.3195
ABC	2	0.1420389	0.0710194	0.744	0.4858
RESÍDUOS	24				
TOTAL (Corrigido)	35	30.823222			

Quadro 3. Análise de variância para a variável matéria seca. Soma dos Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Cálcio no meio	1	3.132900	3.132900	188.761	0.0000**
B: Sacarose no meio	2	64.286617	32.143308	1936.668	0.0000**
C: Variedade	1	0.324900	0.324900	19.576	0.0002**
Interações					
AB	2	0.0789500	0.0394750	2.378	0.1142
AC	1	0.1225000	0.1225000	7.381	0.0120
BC	2	0.6345500	0.3172750	19.116	0.0000**
ABC	2	0.2841500	0.1420750	8.560	0.0016
RESÍDUOS	24				
TOTAL (Corrigido)	35	69.262900			

(Raiz)**Quadro 4-Análise de variância para a variável cálcio. Soma Quadrados Tipo III.**

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Cálcio no meio	1	56.675803	56.675803	145.874	0.0000**
B: Sacarose no meio	2	19.543117	9.771858	25.151	0.0000**
C: Variedade	1	5.236469	5.236469	13.478	0.0012
Interacções					
AB	2	3.627438	1.813719	4.668	0.0194*
AB	1	0.451136	0.451136	1.161	0.2919
BC	2	0.389938	0.194969	0.502	0.6116
ABC	2	6.936772	3.468386	8.927	0.0013**
RESÍDUOS	24	9.324600			
TOTAL (Corrigido)	35	102.18588			

Quadro 5-Análise de variância para a variável comprimento. Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Cálcio no meio	1	0.036100	0.036100	0.412	0.5336
B: Sacarose no meio	2	16.200139	8.100069	92.543	0.0000**
C: Variedade	1	0.243378	0.243378	2.781	0.1084
Interacções					
AB	2	4.220616	2.110308	24.110	0.0000**
AC	1	0.260100	0.260100	2.972	0.0976
BC	2	0.640105	0.320052	3.657	0.0411
ABC	2	0.323316	0.161658	1.847	0.1794
RESÍDUOS	24	2.100666	0.087527		
TOTAL (Corrigido)	35	24.024422			

Quadro 6-Análise de variância para a variável matéria seca da raiz. Soma. Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q.	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: Cálcio no meio	1	0.3670427	0.3670427	25.453	0.0000**
B: Sacarose no meio	2	9.6786670	4.8393335	335.592	0.0000**
C: Variedade	1	0.0390427	0.0390427	2.707	0.1135
Interacções					
AB	2	0.3667747	0.1833873	12.717	0.0002
AC	1	0.0016667	0.0016667	0.116	0.7406
BC	2	0.0404362	0.0202181	1.402	0.2663
ABC	2	0.0044670	0.0022335	0.155	0.8574
RESÍDUOS	23	0.3316667	0.0144203		
TOTAL (Corrigido)	34	10.827069			

ANEXO IX

Análise de variância da experiência 4

(Parte aérea)

Quadro 1-Análise de variância, variável cálcio, (0.45 mM de cálcio por litro de meio). Soma Quadrados Tipo III.

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	M.Q	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: PAR	2	83.985600	41.992800	145.167	0.0000**
B: Variedades	1	0.476939	0.476939	1.649	0.2234
Interacções					
AB	2	0.036044	0.018022	0.062	0.9399
RESÍDUOS	12	3.471266	0.289272		
TOTAL (Corrigido)	17	87.969850			

Quadro 2-Análise de variância, variável cálcio, (4.5 mM de cálcio por litro de meio). Soma Quadrados Tipo III.

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	M.Q	TESTE-F	NÍVEL SI.
Efeitos principais					
A: PAR	2	33.201733	16.600867	38.312	0.0000**
B: Variedades	1	1.875339	1.875339	4.328	0.0596
Interacções					
AB	2	0.020844	0.010422	0.024	0.9763
RESÍDUOS	12	5.199733	0.533311		
TOTAL (Corrigido)	17	40.297650			

Quadro 3-Análise de variância, variável comprimento, (0.45 mM de cálcio por litro de meio). Soma Quadrados Tipo III

FONTE DE VARIACÃO	G.L	S.Q.	M.Q	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: PAR	2	0.021811	0.010905	2.005	0.1773
B: Variedades	1	0.029605	0.029660	5.443	0.0379*
Interacções					
AB	2	0.052877	0.026438	0.062	0.0284*
RESÍDUOS	12	0.065266	0.005438		
TOTAL (Corrigido)	17	0.169561			

Quadro 4-Análise de variância, variável comprimento do hipocótilo, (4.5 mM de cálcio por litro).Soma Quadrados Tipo III.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: PAR	2	5.728878	2.864438	124.391	0.0000**
B: Variedades	1	0.309422	0.309422	13.437	0.0032*
Interacções					
AB	2	0.027877	0.013938	0.605	0.5618
RESÍDUOS	12	0.276333	0.230278		
TOTAL (Corrigido)	17	6.342511			

Quadro 5-Análise de variância, variável peso seco, (0.45 mM de cálcio por litro). Soma Quadrados Tipo III.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: PAR	2	0.397544	0.198772	2.971	0.0895
B: Variedades	1	0.002938	0.002938	0.044	0.8397
Interacções					
AB	2	0.042077	0.042077	0.314	0.7360
RESÍDUOS	12	0.802866	0.066905		
TOTAL (Corrigido)	17	1.245427			

Quadro 6-Análise de variância, variável peso seco, (4.5 mM de cálcio por litro).Soma Quadrados Tipo III.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: PAR	2	0.488677	0.244338	9.304	0.0036*
B: Variedades	1	0.154938	0.154938	5.900	0.0318*
Interacções					
AB	2	0.056677	0.028338	1.079	0.3707
RESÍDUOS	12	0.315133	0.026261		
TOTAL (Corrigido)	17	1.015427			

(Raiz)**Quadro 7-**Análise de variância, variável cálcio, (0.45 mM de cálcio por litro de meio) Soma Quadrados Tipo III.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: PAR	2	102.90861	51.454306	237.939	0.0000**
B: Variedades	1	0.86681	0.866806	4.008	0.0684
Interacções					
AB	2	1.42527	0.712638	3.295	0.0723
RESÍDUOS	12	2.59500	0.216250		
TOTAL (Corrigido)	17	107.79569			

Quadro 8-Análise de variância, variável cálcio, (4.5 mM de cálcio por litro de meio). Soma de Quadrados Tipo III.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: PAR	2	59.29083	29.645417	39.498	0.0000**
B: Variedades	1	10.58000	10.580000	14.096	0.0027*
Interacções					
AB	2	12.93250	6.466250	8.615	0.0048*
RESÍDUOS	12	9.00666	0.750555		
TOTAL (Corrigido)	17	91.81000			

Quadro 9-Análise de variância, variável comprimento, (0.45 mM de cálcio por litro de meio). Soma de Quadrados Tipo III.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: PAR	2	4.492544	2.246272	8.187	0.0057
B: Variedades	1	0.306805	0.306805	1.118	0.3111
Interacções					
AB	2	0.389344	0.194672	0.710	0.5114
RESÍDUOS	12	3.292266	0.274355		
TOTAL (Corrigido)	17	8.480961			

Quadro 10-Análise de variância, variável comprimento (4.5 mM de cálcio por litro de meio). Soma Quadrados Tipo III.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: PAR	2	0.941111	0.4705556	4.514	0.0345*
B: Variedades	1	0.018050	0.0180500	0.173	0.6890
Interacções					
AB	2	0.104933	0.0524667	0.503	0.6167
RESÍDUOS	12	1.250933	0.1042444		
TOTAL (Corrigido)	17	2.315027			

Quadro 11-Análise de variância, variável o factor peso seco, (0.45 mM de cálcio por litro de meio). Soma de Quadrados Tipo III.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: PAR	2	0.024044	0.012022	4.725	0.0307*
B: Variedades	1	0.000200	0.000200	0.079	0.7869
Interacções					
AB	2	0.001600	8.000000	0.314	0.7361
RESÍDUOS	12	0.030533	0.002544		
TOTAL (Corrigido)	17	0.056377			

Quadro 12-Análise de variância, variável peso seco (4.5 mM de cálcio por litro de meio).Soma Quadrados Tipo III.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L	S.Q.	M.Q	TESTE-F	NÍVEL SIG.
Efeitos principais					
A: PAR	2	9.00000	4.500000	0.268	0.7692
B: Variedades	1	8.88889	8.888889	0.053	0.8242
Interações					
AB	2	0.003677	0.0018389	1.096	0.3654
RESÍDUOS	12	0.020133	0.001677		
TOTAL (Corrigido)	17	0.024800			