

## Influência do cálcio sobre o alongamento caulinar de plantas de *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto cultivadas *in vitro*.

Daniela Soares dos Santos<sup>(1)</sup> & Catarina Carvalho Nievola<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica, São Paulo, SP. E-mail para contato: [strobilacea@gmail.com](mailto:strobilacea@gmail.com)

**Resumo:** Nas espécies que formam uma roseta compacta, como em Bromeliaceae, o alongamento do entrenó é quase inteiramente inibido durante o desenvolvimento normal. Contudo, em certas condições de cultivo, o alongamento do caule pode ser observado, como na bromélia *Acanthostachys strobilacea*. Tem sido reportado que o cálcio pode influenciar o alongamento caulinar e sua influência pode ser investigada com o uso de Ionomicina e EGTA ((etileno-glicol-bis (éter  $\beta$ -aminoetil) - N, N, N', N' - tetra-acético), pois ambas as substâncias influenciam as concentrações intracelular do íon, podendo alterar alguns aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas. Este trabalho tem por objetivo verificar o papel do cálcio sobre o desenvolvimento de plantas de *A. strobilacea* cultivadas na condição indutora de alongamento caulinar. Segmentos nodais da espécie foram cultivados *in vitro* em meio nutritivo contendo 0,1, 1 e 10  $\mu$ M de e 1,0 e 10,0 mM de EGTA além de um tratamento controle sem adição destas substâncias. Os explantes permaneceram por 3 meses sob temperatura de 20 °C e fotoperíodo de 12 h. Os resultados mostraram que plantas originárias do desenvolvimento da gema lateral, cultivadas em meio contendo ionomicina não apresentaram alongamento do eixo caulinar, e o EGTA promoveu o alongamento caulinar de *A. strobilacea*, portanto, pode-se inferir que a possível redução da concentração do cálcio intracelular promovido pelo EGTA alterou o padrão de crescimento caulinar de *A. strobilacea*, permitindo que o mesmo se alongasse, sendo assim, o uso destas substâncias viabilizam os estudos da influência do cálcio neste aspecto do crescimento de *A. strobilacea*.

**Palavras-Chave:** Bromeliaceae, ionomicina, EGTA e micropropagação.

### INTRODUÇÃO

Nas espécies que formam uma roseta compacta, como em Bromeliaceae, o alongamento do entrenó é quase inteiramente inibido durante o desenvolvimento normal (Tsukaya 2005). Contudo, em certas condições de cultivo, o alongamento pode ocorrer, evidenciando os segmentos nodais com aumento da distância dos entrenós, conforme observado para *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto (Santos *et al.* 2010). Essa espécie é epífita ou saxícola pertencente à subfamília Bromelioideae.

A inibição do alongamento caulinar pode ser resultado tanto da inibição da expansão quanto da divisão celular (Sachs 1965). De acordo com Bennet-Clark (1956), o cálcio exerce um papel fundamental nesta resposta da planta, uma vez que a alteração da concentração intracelular pode resultar tanto na inibição do crescimento da parte aérea quanto no alongamento de células e tecidos. Estas respostas podem estar relacionadas ao papel sinalizador do cálcio em eventos de desenvolvimento vegetal, e também como de constituinte celular, uma vez que este íon pode ser componente da lamela média das paredes celulares, cofator enzimático, estar envolvido na permeabilidade de membrana e ainda por sua ação como mensageiro secundário na transdução de sinais (Evert & Eichhorn 2014).

A concentração de cálcio no citoplasma da célula é mantido baixo, varia entre 100-200 nM, contudo, a concentração de cálcio na parede celular e nas organelas são na ordem de milimolar (Reddy 2001). Avaliação do papel do cálcio tem sido investigada com uso da ionomicina que é um antibiótico capaz de extrair íons a partir de uma fase aquosa para uma fase orgânica, e também atua como transportador desse cátion através de uma

barreira de solvente com grande afinidade pelo cálcio (Liu & Hermann 1978), e tem por finalidade estimular a liberação do cálcio presentes nas organelas celulares aumentando os níveis deste íon no citosol. O EGTA (ácido etilenoglicol- bis(-aminoetileter)- tetraacético), atua como quelante do íon cálcio, uma vez ligado ao íon, impede sua ação, este quelante pode remover o cálcio ligado a parede celular (Hepler & Wayne 1985), tornando-a mais plástica, ou seja, estas duas substâncias podem provocar respostas antagônicas durante o crescimento e desenvolvimento vegetal. Diversos trabalhos utilizam a ionomicina e o EGTA para investigar o papel do cálcio em diversos aspectos do crescimento e desenvolvimento de plantas (Morgan & Jacob, 1994; Taybi & Cushman, 1999; Pang *et al.* 2007; Nomura *et al.* 2014).

Este trabalho tem por objetivo verificar o papel do cálcio sobre o desenvolvimento de plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* na condição indutora de alongamento caulinar.

## MATERIAL E MÉTODOS

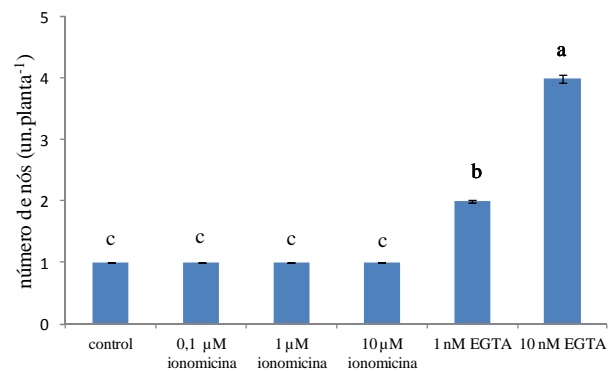
Para este estudo foram utilizados segmentos nodais obtidos do cultivo *in vitro* de sementes de plantas de *Acanthostachys strobilacea* alongadas *in vitro* (Santos *et al.* 2010), coletadas de matrizes localizadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP (22°15' 04.2" S e 47°09'56.8" W) e armazenadas a 10 °C, no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Pesquisa em Planta Ornamentais (NPPO), do Instituto de Botânica. Foram utilizados 8 frascos de 250 ml contendo 40 ml de meio de Murashige & Skoog (1962), com macronutrientes reduzidos a um quinto da concentração original (MS/5) adicionado de 0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$  de ionomicina (ionóforo de cálcio) e 1,0 e 10,0 mM de EGTA (etileno-glicol-bis (éter  $\beta$ -aminoetil) - N, N, N', N' - tetra-acético), estas substâncias foram preparadas em água destilada, sendo em seguida filtradas em membrana de acetato de celulose (0,45  $\mu\text{m}$  diâmetro dos poros), antes de serem adicionadas ao meio de cultura previamente esterilizado. Em cada frasco foram depositados 6 nós totalizando 48 explantes por tratamento (6 por frasco). Os nós de todos os tratamentos foram mantidos em câmaras de germinação ajustadas nas temperaturas de 20 °C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , por um período de 3 meses, em seguida foram quantificados os números de nós e o comprimento do entrenó das plantas.

## Análise estatística

As médias obtidas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) fator único. Para comparação entre as médias, foi aplicado teste de Tukey com nível de significância de 5 %.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 90 dias de cultivo *in vitro*, os resultados mostraram que o cálcio pode influenciar no alongamento caulinar de plantas *A. strobilacea*, quando mantidas sob temperatura de 20 °C. A figura 1 mostra que na presença de ionomicina no meio de cultura as plantas não apresentaram diferenças significativas no número de nós quando comparadas com as plantas controle, este resultado mostra que um aumento na concentração de cálcio no protoplasma celular não induz alongamento caulinar de *A. strobilacea* quando cultivada *in vitro* nas concentrações de ionomicina utilizadas neste trabalho, a influência desta substância no crescimento e desenvolvimento de plantas possivelmente poderá ser detectada se alterada as concentrações utilizadas nos tratamentos. Contudo, na presença de EGTA as plantas apresentaram em média 2 e 4 unidades de nós (1 e 10 nM de EGTA, respectivamente).

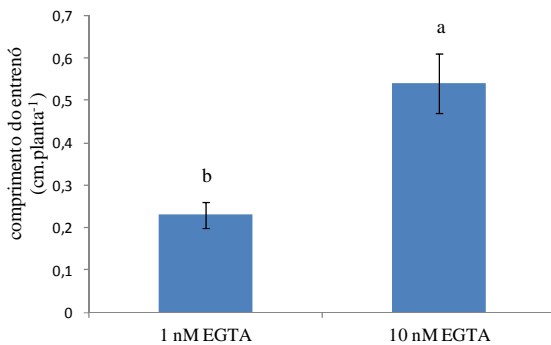


**Figura 1.** Número de nós quantificados no eixo caulinar de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* em meio nutritivo contendo 0,1; 1,0 e 10  $\mu\text{M}$  de ionomicina e 1 e 10 nM de EGTA e um meio controle contendo somente MS/5.

Este resultado pode estar relacionado ao fato de que na parede celular o cálcio desempenha um papel fundamental na ligação cruzada de resíduos de pectina ácida, assim, baixa concentração de cálcio deve tornar a parede celular mais flexível, facilitando o alongamento celular, enquanto altas concentrações devem enrijecer a parede e torná-la

menos plástica (Wyn & Lunt 1967; Burström 1968), dificultando o alongamento. E o EGTA pode ter atuado removendo o cálcio da parede celular. Tornando-a mais suscetível ao alongamento.

A figura 2 mostra que o número de nós observados nos tratamentos com EGTA foi acompanhado de um alongamento do entrenó do eixo caulinar de plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro*.



**Figura 2.** Comprimento do entrenó do eixo caulinar de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* em meio nutritivo contendo 0,1; 1,0 e 10  $\mu$ M de ionomicina e 1 e 10 nM de EGTA e um meio controle contendo somente MS/5.

A presença de EGTA no meio nutritivo induziu o alongamento do entrenó em com 0,23 e 0,54 cm de comprimento (1 e 10 nM respectivamente).

Outros autores verificaram o efeito do EGTA no alongamento de estruturas vegetais. Moll & Jones (1981) observaram que a adição de EGTA aumenta a taxa de crescimento de segmentos de hipocótilos isolados na ausência de ácido giberélico no mesmo nível de crescimento induzido pelo fitorregulador, esses autores afirmam que a diminuição deste cátion divalente em níveis menores que o normal para a célula promove rapidamente o crescimento de hipocótilo de *Lactuca sativa* L. A rápida resposta de crescimento na presença deste quelante indica a capacidade da substância de remover o cálcio da parede celular.

## CONCLUSÕES

O cálcio é um íon relacionado ao aspecto alongado das plantas de *A. strobilacea*.

O EGTA pode ser utilizado na investigação da influência do cálcio no alongamento do eixo caulinar de *A. strobilacea* cultivada *in vitro* a 20°C.

Para investigar o efeito da ionomicina no crescimento e desenvolvimento de plantas, outras concentrações deverão ser testadas em trabalhos posteriores.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bennet-Clark, T.A.** 1956. Salt accumulation and mode of action of auxin. A preliminary hypothesis. In Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances, R.L. Wain and F. Wightman, eds (London: Butterworths), pp. 284–291.
- Burström, H.G.** 1968. Calcium and plant growth. Biol. Rev. (Camb.) 43: 287–316.
- Evert, R.F. & Eichhorn, S.E.** 2014. Biologia vegetal. Guanabara Koogan. 8 ed. 856 p.
- Hepler, P.K. & Wayne, R.O.** 1985. Calcium and plant development. Annual Review of Plant Physiology, 36(1), 397-439.
- Liu, C. & Hermann, T.E.** 1978. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. The Journal Biological Chemistry. 253: 5892-5894.
- Moll, C. & Jones, R.L.** 1981. Short-term kinetics of elongation growth of gibberellin-responsive lettuce hypocotyl sections. Planta 152: 442-449.
- Morgan, A.J., & Jacob, R.** 1994. Ionomycin enhances Ca<sup>2+</sup> influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. J. Biochem 300: 665-672.
- Murashige, T. & Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–97.
- Nomura, H., & Shiina, T.** 2014. Calcium signaling in plant endosymbiotic organelles: mechanism and role in physiology. Molecular plant 20: 15-19 .
- Pang, X., Halaly, T., Crane, O., Keilin, T., Keren-Keiserman, A., Ogrodoitch, A. & Or, E.** 2007. Involvement of calcium signalling in dormancy release of grape buds. *Journal of experimental botany*, 58(12), 3249-3262.
- Reddy, A.S.N.** 2001. Calcium: silver bullet in signaling. Plant Science. 160: 381-404.
- Sachs, R.M.** 1965. Stem elongation. Annual Review of Plant Physiology. 16 (1): 73-96.
- Santos, D.S., Tamaki V. & Nievola C.C.** 2010. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. In Vitro Cell Dev Biol – Plant. 46:524–529.
- Taybi, T. & Cushman, J.C.** 1999. Signaling Events Leading to Crassulacean Acid Metabolism Induction in the Common Ice Plant. Plant Physiology. 121: 545–555.

**Tsukaya, H.** 2005. Leaf shape: genetic controls and environmental factors. *International Journal of Developmental Biology*. 49(5/6): 547.

**Wyn, R.G. & Lunt, O.R.** 1967. The function of calcium in plants. *Bot. Rev* 33: 407–426.