

Camila Pereira de Carvalho

**Influência de baixas temperaturas no
crescimento, conteúdo de carboidratos e
aclimatização da bromélia endêmica *Nidularium
minutum* Mez. cultivada *in vitro***

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2012

Camila Pereira de Carvalho

**Influência de baixas temperaturas no
crescimento, conteúdo de carboidratos e
aclimatização da bromélia endêmica *Nidularium
minutum* Mez. cultivada *in vitro***

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. CATARINA CARVALHO NIEVOLA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Carvalho, Camila Pereira de
C331i Influência de baixas temperaturas no crescimento, conteúdo de carboidratos e
aclimatização da bromélia endêmica *Nidularium minutum* Mez. cultivada *in vitro* /
Camila Pereira de Carvalho -- São Paulo, 2012.
119 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2012
Bibliografia.

1. Bromeliaceae. 2. Preservação. 3. Anatomia. I. Título

CDU: 582.564

Aos meus pais e irmão,
pelo carinho e apoio.

Ao Gustavo, pelo companheirismo,
incentivo e amor.

Dedico.

*“Não há promessas para
amarrar o futuro.
Há confissões de amor
para celebrar o presente.”*

Rubem Alves

*“Nossa loucura é a mais sensata das emoções;
Tudo o que fazemos deixamos como exemplos
para os que sonham um dia serem assim
como nós: loucos, mas felizes.”*

Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, por disponibilizar as dependências para o desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Botânica, em especial a Dra. Rita de Cássia L. Figueiredo-Ribeiro, Márcia Regina Ângelo e Elvis José Nunes da Silva, por toda ajuda durante estes dois anos de mestrado e pela colaboração durante os congressos científicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida, fundamental para a execução deste projeto.

À Dra. Elisa M. Aoyama, minha primeira orientadora, quem me apresentou este mundo maravilhoso da botânica e sempre acreditou em mim, me incentivando a seguir adiante.

À minha orientadora, Dra. Catarina Carvalho Nievola, por me aceitar como estagiária e posteriormente aluna de mestrado. Por todo ensinamento transmitido, pela paciência, atenção e por acreditar no meu trabalho. Você é um exemplo de pessoa e profissional.

À Dra. Marcia Regina Braga e Dra. Adriana Hissae Hayashi, pelo auxílio na orientação, respectivamente, das análises de carboidratos e anatômicas, por toda a paciência em ir comigo na bancada do laboratório, me ensinando as técnicas e a interpretar os resultados obtidos.

Aos pesquisadorese funcionários do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, em especial a Dra. Vívian Tamaki e ao Ivomar pelo auxílio durante as coletas em Paranapiacaba. Ao Sr. Geraldo, que me ajudou durante a etapa de aclimatização das plantas.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, David, Bia, Carol, Nara, Cléber, Sabrina, Flávia, Cristiano, Denise, Jorge, Naomi, Priscila, Paola, Patrícia e Luciana, agradeço a amizade, o carinho, as risadas, as viagens de congressos, as conversas sobre os projetos, aprendi muito com vocês durante todo esse tempo juntos! Em especial as amigas “do frio” Victória e Daniela, obrigada por todas as discussões sobre as plantas tropicais e o frio, a ajuda com as análises estatísticas e interpretação dos dados, a paciência no laboratório e pelos momentos de desabafo. Dani, obrigada por me oferecer abrigo em São Paulo, quando eu precisei você estava do meu lado, sempre uma pessoa boa e prestativa, você mora no meu coração!

À Sarah, uma amizade que começou no Núcleo, mas continuou até depois do fim do estágio.

Aos funcionários do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Mary Monteiro, Ana Alice, Cida e Pedro, sempre me auxiliando quando precisei. Aos alunos e estagiários do laboratório, agradeço pela convivência e ajuda nas análises, em especial ao Evandro, Fernanda Zaninette, Aline Coelho, Vanessa Fuentes, Daiane Broch e Fernanda K. À Marina Veronesi, que me emprestou o seu valioso caderno, me ajudando nas análises de carboidratos e na interpretação dos dados de HPLC, e a Daiane Antunes, agradeço as conversas e o carinho, sempre me incentivando, me ajudando no laboratório e fora dele também.

Aos pesquisadores do Núcleo de Anatomia, Dra. Agnes Elisete Lucchi, Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros e Dra. Edenise Segala Alves, pelos conhecimentos transmitidos e boa convivência. Aos funcionários do laboratório, Maria Manoel e Nilton, sempre dispostos a ajudar. As colegas Poliana, Fátima, Andréa e Bárbara, agradeço a ajuda no laboratório e também aos momentos de descontração.

Aos membros da minha banca de qualificação, Dra. Maria Ângela Machado de Carvalho, Dr. Rogério Mamoru e Dra. Ana Paula Vaz, pelas valiosas contribuições.

Ao Núcleo de Sementes, por permitir o uso da câmara de crescimento na temperatura de 10°C. Ao amigo Edmir Lamarca, pelo auxílio no laboratório de Sementes e pelas conversas e momentos de descontração.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Botânica, pela atenção e bom atendimento.

Ao alojamento do Instituto de Botânica, em nome da funcionária responsável Dinorah Evangelista, por apoiar os alojados e sempre estar disposta a nos ouvir. Agradeço a todos os colegas de alojamento, tanto os moradores fixos como os temporários, aprendi muito com todos vocês, desde conversas e desabafos sobre os projetos desenvolvidos até um pouco da cultura e da região do Brasil, ou até mesmo do exterior. Em especial a Gisele, Fernanda Karstedt, Ana Lívia, Janaina, Cristiane do Nascimento, Simone Wengrat, Ana Cristina, Talita, Jadson, Pedro e Aluísio.

À Ana Margarita, pelos bons momentos e experiências compartilhadas. Saiba que a sua amizade é muito importante para mim!

À Simone Silva e Priscilla Denise, minhas eternas amigas do quarto 3, tantos bons momentos vivemos juntas, vocês me ajudaram e muito durante estes dois anos, me acolheram no quarto de vocês, me apoiaram e ouviram meus desabafos, tornando mais fácil a minha mudança para São Paulo.

Aos professores do Instituto de Biociências da Universidade de Taubaté, em especial as professoras Dra. Ana Cristina Gobbo, pelo incentivo constante, amizade, carinho e exemplo de pessoa, Dra. Simey Thury Vieira Fisch, pelos valiosos ensinamentos sobre

botânica, amizade e companhia durante os congressos. Aos funcionários, pelo incentivo e carinho.

À Cris, minha companheira de viagem São Paulo-Taubaté-São Paulo, pela amizade, carinho e bate-papos botânicos.

Às minhas amigas Julia e Mariana, por sempre me incentivarem a lutar pelos meus sonhos, pelos momentos de descontração e risadas. Vocês são muito especiais!

À Marta, Dô e Thiago, por sempre me acolherem em sua casa com os braços abertos, com todo carinho e amor. A ajuda de vocês foi essencial para a realização do meu mestrado. Não tenho palavras para agradecer!

Aos meus pais e avós, por me apoiarem e me amparem nos momentos difíceis, pela paciência, pela compreensão dos meus períodos de ausência. Ao meu irmão Fernando, pela ajuda com a tradução do abstract. Amo muito vocês!

À Benê e meus sobrinhos lindos, pelos momentos de descontração, renovando minhas energias para continuar a seguir em frente.

Ao meu querido Gustavo, pelo amor e carinho dedicados, pela enorme paciência, por ouvir meus desabaços, por compreender o meu sonho e me ajudar a conquistá-lo.

À Deus, minha força em todos os momentos.

Registro minhas desculpas aos nomes que não tenha mencionado, mas agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
Bromeliaceae.....	1
Formação de uma coleção <i>in vitro</i> de crescimento lento visando a preservação de espécies ameaçadas.....	2
Alterações morfológicas e fisiológicas durante a exposição a baixas temperaturas.....	4
Aclimatização de plantas após cultivo <i>in vitro</i> sob baixas temperaturas.....	7
Objetivos.....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
Capítulo 1 - Efeito da baixa temperatura no crescimento, anatomia e conteúdo de carboidratos na bromélia endêmica <i>Nidularium minutum</i> Mez. cultivada <i>in vitro</i>	15
Resumo.....	15
Abstract.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1. Material vegetal.....	20
2.2. Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> de <i>Nidularium minutum</i> em diferentes temperaturas.....	20
2.3. Parâmetros avaliados.....	23
2.3.1. Porcentagem de sobrevivência.....	23
2.3.2. Análise biométrica.....	23
2.3.3. Determinação massa.....	23
2.3.4. Teor Hídrico.....	23
2.4. Taxa de Crescimento Relativo (TCR).....	23
2.5. Determinação do teor de clorofila e carotenoides	24
2.6. Análise estrutural.....	24
2.6.1. Anatomia foliar de plantas adultas.....	24
2.6.2. Anatomia foliar de plantas cultivadas <i>in vitro</i>	25
2.7. Análise de carboidratos.....	25
2.7.1. Quantificação de carboidratos solúveis.....	26
2.7.2. Análise de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD).....	26
2.7.3. Dosagem de amido.....	26

2.7.4. Extração da parede celular.....	26
2.7.4.1. Hidrólise ácida e quantificação de açúcares.....	27
2.8. Delineamento estatístico.....	27
3. RESULTADOS.....	28
3.1. Caracterização das plantas de <i>Nidularium minutum</i> antes de serem transferidas para os diferentes tratamentos térmicos (Tempo zero).....	28
3.2. Avaliação do crescimento de plantas de <i>Nidularium minutum</i> mantidas em diferentes temperaturas.....	28
3.3. Teor de clorofilas e carotenoides.....	35
3.4. Análise anatômica.....	37
3.5. Análise do conteúdo de carboidratos nas plantas de <i>Nidularium minutum</i> mantidas em diferentes temperaturas.....	43
3.5.1. Carboidratos solúveis e amido.....	43
3.5.2. Carboidratos estruturais.....	46
4. DISCUSSÃO.....	49
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
Capítulo 2 - Efeito da temperatura de cultivo <i>in vitro</i> na aclimatização da bromélia endêmica <i>Nidularium minutum</i> Mez.....	64
Resumo.....	64
Abstract.....	65
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	68
2.1. Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> de <i>Nidularium minutum</i> em diferentes temperaturas.....	68
2.2. Estabelecimento da aclimatização (cultivo <i>ex vitro</i>).....	68
2.3. Parâmetros avaliados.....	72
2.3.1. Sobrevivência.....	72
2.3.2. Análise biométrica.....	72
2.3.3. Determinação de massa.....	72
2.3.4. Teor hídrico.....	72
2.4. Taxa Relativa de Crescimento (TCR).....	72
2.5. Determinação do teor de clorofila e carotenoides.....	73
2.6. Delineamento estatístico.....	73
3. RESULTADOS.....	74

3.1. Avaliação da sobrevivência e do crescimento de plantas de <i>N. minutum</i> aclimatizadas <i>ex vitro</i>	74
3.2. Teor de clorofilas e de carotenoides em plantas de <i>N. minutum</i> aclimatizadas <i>ex vitro</i>	92
4. DISCUSSÃO.....	94
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS & PERSPECTIVAS.....	103
RESUMO.....	107
ABSTRACT.....	108

INTRODUÇÃO GERAL

Bromeliaceae

Bromeliaceae inclui cerca de 60 gêneros e 3.248 espécies, apresentando uma distribuição quase exclusivamente Neotropical (Luther 2010), sendo citada apenas a espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbraed existente na costa ocidental da África. A família era dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae. Atualmente, a nova classificação proposta, baseada em análises filogenéticas, divide esta família em oito subfamílias: Brochinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Bromelioideae (Givnish *et al.* 2007, Givnish *et al.* 2011). Bromeliaceae está presente em praticamente todos os ambientes, estendendo-se do nível do mar à cordilheira dos Andes e desde locais úmidos como a Mata Atlântica até regiões secas como a Caatinga (Nunes 2006). No Brasil, ocorrem cerca de 40% das espécies e 73% dos gêneros (Leme & Marigo 1993).

A família reúne plantas terrestres, epífitas ou rupícolas. Suas folhas frequentemente formam densas rosetas, geralmente com espinhos (Souza & Lorenzi 2005), apresentando uma superfície recoberta por tricomas especializados (escamas foliares) de diversas formas, sendo apêndices para a absorção de umidade e nutrientes (Benzing 2000). Uma grande importância ecológica é associada às bromélias, pois muitas espécies possuem “tanque”, que são estruturas formadas pela sobreposição das folhas da roseta que tem a função de um reservatório de água e nutrientes (Benzing 2000), servindo de habitat, local de reprodução e alimentação para pequenos animais que vivem associados.

No Brasil as bromélias são particularmente comuns em florestas úmidas, principalmente na Mata Atlântica (Souza & Lorenzi 2005), que abriga cerca de 80% dos gêneros (Leme & Marigo 1993). Este bioma é um dos *hotspots* de biodiversidade reconhecidos no mundo, áreas que perderam pelo menos 70% da sua cobertura vegetal original, mas que apresentam um alto grau de endemismo (Galindo-Leal & Câmara 2005).

A bromélia *Nidularium minutum* Mez. habita uma região coberta predominante pela Mata Atlântica. Esta espécie possui hábito terrestre e se propaga por estolho, apresentando características que a conferem um grande potencial ornamental, como a folhagem de coloração verde-clara intensa, com brácteas verdes e as extremidades avermelhadas e pequenas flores brancas pontuando o centro da inflorescência (Tavares & Barros 2009). Esta espécie é endêmica da Serra de Paranapiacaba, localizada no Estado de São Paulo, região que abriga a Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. Esta Reserva abrange uma

área de 336 hectares e possui relevo caracterizado pela presença de morros, com altitudes variando entre 750 e 891 metros. De acordo com a característica climática regional, essa área apresenta um regime de chuvas com os maiores totais pluviométricos mensais nas estações de primavera-verão e os menores nas de outono-inverno (Gutjahr & Tavares 2009). Em relação à temperatura, estes mesmos autores relatam que a proximidade do oceano e a ocorrência da Mata Atlântica atuam como fatores que diminuem os valores térmicos extremos, com temperaturas não muito elevadas no verão, ao redor de 21°C, nem muito frias no inverno, entre 14 e 15°C, o que leva a classificação do clima como tropical de altitude.

Devido à grande diversidade de espécies, típica arquitetura foliar e variação morfológica, as bromélias ocupam lugar de destaque entre as plantas ornamentais produzidas e comercializadas no Brasil. A presença de brácteas e flores vistosas que podem durar vários meses e folhas que têm um apelo visual elevado, lhes conferem um valor estético muito apreciado no mercado de plantas ornamentais. Além disso, são plantas de alta durabilidade, sendo muito utilizadas no paisagismo (Nunes 2006). Entretanto, a coleta predatória de exemplares para comercialização e a depredação de seu ambiente natural são os principais responsáveis pela drástica redução ou até mesmo pela extinção, de inúmeras espécies destas plantas (Pereira *et al.* 2008). No caso de *N. minutum*, além de endêmica, consta como vulnerável na Lista publicada no Livro Vermelho das Espécies Vegetais Ameaçadas de Extinção (Mamede *et al.* 2007). Deste modo, são relevantes medidas de conservação para esta espécie.

Formação de uma coleção *in vitro* de crescimento lento visando a preservação de espécies ameaçadas

A conservação de plantas é uma tarefa que requer uma variedade de ferramentas. A proteção das plantas *in situ*, isto é, no habitat natural em que ela ocorre, é de importância primária, mas nem sempre é suficiente para garantir a sobrevivência da espécie (Pence 2011). Quando isto ocorre, outros métodos podem ser usados para aumentar e suplementar esta proteção, sendo que as técnicas *ex situ* (conservação fora do ambiente natural) podem representar a única opção para conservar espécies raras e altamente ameaçadas (Engelmann 2011).

Os programas de conservação são realizados por organizações nacionais e internacionais e por jardins botânicos ou instituições similares. Eles envolvem uma gama de estratégias diferentes incluindo estudos genéticos e ecológicos de plantas, gestão de habitat e conservação *ex situ* no campo e bancos de sementes (Fay 1992). Em adição, técnicas de cultivo *in vitro* são usadas em certas circunstâncias.

Cultura de tecidos vegetais é o termo usado para uma série de procedimentos empregados para manter e crescer células de plantas (calos, células, protoplastos) e órgãos (caules, raízes, embriões) de modo asséptico (*in vitro*) em um meio nutritivo e ambiente controlado, o que permite obter plantas livres de doenças (Hartmann *et al.* 2002). A miniaturização das plantas reduz espaço e, conseqüentemente, o custo laboratorial para a manutenção das mesmas (Engelmann 2011). Esta técnica pode ser utilizada para propagação, melhoramento de plantas, preservação de germoplasma, entre outros.

O processo de preservação *in vitro* apresenta diversas vantagens sobre o processo de conservação *ex situ* no campo, e dentre elas destacam-se a necessidade de menor espaço para dispor o material; a manutenção de material vegetal livre de pragas e patógenos; a disponibilidade de material para ser imediatamente propagado; a redução dos custos de manutenção; a elevada taxa de multiplicação, independentemente de condições climáticas; a redução da erosão genética; e a simplificação e eficiência do processo de intercâmbio de germoplasma (Fortes & Pereira 2001).

Na literatura existem diversos relatos sobre o uso do cultivo *in vitro* para a propagação de plantas de interesse agrícola (Lemos *et al.* 2002, Hao & Deng 2003), madeireiro (Nunes *et al.* 2002, Renau-Morata *et al.* 2006, Sarmast *et al.* 2012), farmacêutico (Islam *et al.* 2005, Camillo *et al.* 2009), plantas ornamentais (Aranda-Peres *et al.* 2009, Ávila-Diaz *et al.* 2009, Santos *et al.* 2010), entre outros. O uso desta técnica para plantas ameaçadas tem provado ser útil para uma extensiva gama de espécies, sendo possível citar o seu uso em trabalhos recentes para uma espécie da Índia (*Polygonatum verticillatum* (L.) All.) (Bisht *et al.* 2012) e outra da Tailândia (*Stemona hutanguriana* W.Chuakul) (Prathanturarug *et al.* 2012). A cultura de tecidos pode produzir uma grande quantidade de plantas a partir de um mínimo de material vegetal original, o que representa um baixo impacto na população nativa em extinção (Souza *et al.* 2009). Ademais, as plantas oriundas de sementes podem ser usadas para suplementar o estoque natural de populações de plantas silvestres.

Por meio do cultivo *in vitro* é possível a formação de uma coleção de plantas, reduzindo-se o crescimento destas na condição *in vitro*, sem prejudicar o seu desenvolvimento. Esta metodologia pode contribuir para a formação de um banco de germoplasma constituído por sementes de várias populações da mesma espécie, garantindo a variabilidade genotípica necessária a programas de conservação (Vieira 2000, Carneiro & Mansur 2004).

A manutenção dos recursos fitogenéticos se executa quando são feitas mudanças no ambiente de cultivo para desacelerar o crescimento das plantas, sendo que o objetivo é aumentar ao máximo o período de subcultivo ou estendê-lo indefinidamente, para com isso se

reduzir a mão de obra e o espaço necessário (George 1993). Deste modo, é possível a formação de coleções *in vitro* de crescimento lento.

Entre os vários métodos para se produzir uma coleção *in vitro* de crescimento lento está a redução da luz, do oxigênio, da concentração de nutrientes e da temperatura (Evans *et al.* 2003), além da suplementação com agentes osmóticos e inibidores de crescimento (Souza *et al.* 2009). Withers (1985) sugere a redução da temperatura de crescimento como primeiro fator limitante a ser testado, já que a baixa temperatura no cultivo *in vitro* reduz a ação de enzimas e do metabolismo geral das plantas (Lemos *et al.* 2002), sendo considerado o fator mais importante para limitar o crescimento das plantas (Souza *et al.* 2009).

Para plantas de clima temperado, é viável o uso de temperaturas variando de 0 a 5°C (Rao 2004), tendo como exemplo o cultivo *in vitro* a 4°C de macieira (*Malus pumila* cv. Gala) (Hao & Deng 2003) e 5°C para *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link. (Gonçalves & Romano 2007). Espécies de clima tropical podem sofrer injúrias com o uso de temperaturas abaixo de 10°C para a formação de uma coleção *in vitro* de crescimento lento (Benson 2008), por isso é recomendado o uso de temperaturas acima de 15°C (Pierik 1987, Rao 2004, Souza *et al.* 2009). Como exemplo para espécies tropicais, pode-se citar o uso da temperatura de 18°C para a redução do cultivo *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* (Lima-Brito *et al.* 2011) e 15°C para as bromélias tropicais *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra (Pedroso *et al.* 2010) e *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Mollo *et al.* 2011). Não há relatos sobre o cultivo *in vitro* de *N. minutum* em baixas temperaturas.

Todavia, para cada espécie existe um limite térmico que reduz o crescimento sem provocar danos, por isso são necessárias investigações para se determinar qual é a temperatura de cultivo *in vitro* ideal, para se formar uma coleção de crescimento lento, levando em conta esses aspectos. Tem sido relatado que a tolerância a baixas temperaturas pode induzir adaptações morfológicas e fisiológicas nas plantas, sendo importante conhecer quais as adaptações envolvidas caso seja identificada a resistência ao frio pela bromélia *N. minutum*.

Alterações morfológicas e fisiológicas durante a exposição a baixas temperaturas

A baixa temperatura pode levar a modificações na morfologia externa e interna das plantas. De acordo com Majada *et al.* (2000), embora as características anatômicas das folhas sejam determinadas geneticamente, as condições ambientais têm forte influência sobre as suas estruturas.

Um aumento na espessura das folhas foi relatado para *Brassica napus* L. var. *oleifera* L. ao ser submetida a baixa temperatura (Stefanowska *et al.* 1999). Quando cultivada na temperatura de 2°C, as folhas dessa espécie apresentaram uma espessura maior quando

comparadas com as plantas cultivadas a 20°C (dia)/15°C (noite). Este aumento na espessura também foi encontrado para o espinafre (*Spinacia oleracea* L. cv. Savoy), que apresentou de duas a três camadas de parênquima paliçádico quando cultivado a 5°C, com uma espessura de 567 µm, e de uma a duas camadas deste mesmo parênquima a 16°C, tendo uma espessura de 290 µm (Boese & Huner 1990). Estes mesmos autores atribuíram essa alteração à resistência a fotoinibição, já que a atenuação da luz absorvida pelas células do parênquima paliçádico pode reduzir a proporção de células expostas à alta intensidade luminosa.

O tamanho das células do parênquima também pode sofrer influência da temperatura. Em *Brassica napus* var. *oleifera* foi verificado aumento no comprimento das células dos parênquimas paliçádico e lacunoso e também das células epidérmicas da face adaxial e abaxial da folha quando expostas a 2°C e comparadas com aquelas a 20°C (dia)/15°C (noite) (Stefanowska *et al.* 1999). Os autores relatam uma mudança no padrão da expansão das células devido à exposição ao frio. As células das plantas crescidas a 20°C (dia)/15°C (noite) apresentaram decréscimo na dimensão perpendicular a superfície foliar, indicando que a expansão dessas células ocorre principalmente na direção paralela, sendo que o oposto foi verificado quando mantidas no frio. Esta diferença na expansão está associada ao aumento da espessura do mesofilo das plantas a 2°C.

Para bromélias cultivadas em baixas temperaturas, foi realizada a anatomia foliar de *Vriesea inflata* (Pedroso *et al.* 2010) e do abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. Smooth Cayenne) (Nievola *et al.* 2005). Para *Vriesea inflata*, foi observado os mesmos tecidos e estruturas nas plantas mantidas *in vitro* a 15°C e 28°C, sendo que não foi verificado um aumento em espessura na folha de plantas provenientes da baixa temperatura, mas um número menor de células do parênquima aquífero, o que foi correlacionado com as menores taxas de massa seca encontrada nas plantas crescidas a 15°C. No abacaxi houve um aumento na espessura das folhas em plantas cultivadas a 28°C (dia)/15°C (noite) quando comparadas com aquelas cultivadas em 28°C constantes (Nievola *et al.* 2005). Também foi verificado um sistema vascular mais conspícuo nas plantas mantidas a 28°C (dia)/15°C (noite).

Além de alterações estruturais, a percepção a baixas temperaturas leva a diversas mudanças no metabolismo das plantas, que incluem alterações no ciclo celular, na arquitetura da parede, na fluidez da membrana, acúmulo de açúcares, rearranjo do citoesqueleto e modificações na composição dos pigmentos fotossintéticos (Haldimann 1999, Taiz & Zeiger 2006, Benson 2008).

Evidência do efeito protetor dos açúcares pode ser observada em diversos trabalhos (Guy *et al.* 1992, Sasaki *et al.* 1996, Santos 2000, Mollo *et al.* 2011). Grande quantidade de açúcares como a sacarose, trealose e oligossacarídeos de cadeia longa (rafinose e estaquiase)

podem acumular nas plantas durante a exposição ao frio (Yuanyuan *et al.* 2009). Acredita-se que os açúcares atuem na aquisição de tolerância a desidratação causada pelo resfriamento, agindo como um agente osmótico externo, removendo o excesso de água intracelular por meio de um gradiente osmótico (Dumet *et al.* 2003). Outra hipótese seria que estes açúcares podem substituir a água removida das biomoléculas, mantendo as estruturas hidrofílicas na sua orientação hidratada mesmo depois da água ter sido removida (Santos 2000). Observou-se que os grupos de hidroxila dos açúcares (sacarose e trealose) se ligam aos grupos hidrofílicos das cabeças polares dos fosfolípidos e grupos funcionais das proteínas da bicamada da membrana por meio de pontes de hidrogênio, substituindo as moléculas de água removidas (Crowe *et al.* 1997). Deste modo, as interações hidrofílicas necessárias são mantidas, conservando a integridade das membranas.

O aumento do conteúdo de carboidratos solúveis, como glucose, frutose e sacarose foi verificado em folhas de espinafre (*Spinacia oleracea* cv. Winter Bloomsdale) cultivadas a 5°C constantes quando comparado com plantas crescidas a 25°C (Guy *et al.* 1992). O acúmulo da sacarose pode ter decorrido em razão do aumento da atividade da enzima sacarose fosfato sintase, ou da redução do transporte desse açúcar, em virtude da redução da taxa metabólica das plantas expostas a baixa temperatura. Para bromélias cultivadas sob baixas temperaturas, o trabalho de Mollo *et al.* (2011) mostrou um aumento no conteúdo de *myo*-inositol, glucose, frutose e sacarose na bromélia imperial *Alcantarea imperialis* mantida *in vitro* a 15°C em relação aquela cultivada a 30°C, sendo atribuído a estes açúcares o papel crioprotetor para estas plantas.

Embora as plantas continuem a fazer fotossíntese quando mantidas sob baixas temperaturas, o rendimento em fotoassimilados não é investido no crescimento. Deste modo, há um aumento na concentração destes solutos no citoplasma, o que estabiliza o equilíbrio termodinâmico em uma condição de alto conteúdo intracelular, tornando menor o risco do estresse promovido pela desidratação ocasionada pelo frio (Larcher 2006).

Alterações na composição dos carboidratos da parede celular também estão relacionadas com a proteção ao frio (Stefanowska *et al.* 1999, Solecka *et al.* 2008, Wolf *et al.* 2012). Os carboidratos são os principais constituintes químicos da parede celular, juntamente com as proteínas estruturais e compostos fenólicos. Dentre eles, encontram-se a celulose, as hemiceluloses e os polissacarídeos ácidos (pectinas). As pectinas incluem polímeros ricos em ácidos urônicos (ramnogalacturonanos), que se apresentam ramificados por polissacarídeos neutros como arabinanos, galactanos e arabinogalactanos (Carpita & McCann 2000). A modificação mais característica na parede celular durante a exposição ao frio é o aumento do teor das pectinas (Solecka *et al.* 2008), atribuído à inibição da expansão da aérea foliar e a

promoção do crescimento foliar em espessura (Stefanowska *et al.* 1999). As pectinas formam uma fase gel hidratada na qual está imersa a rede de celulose-hemiceluloses. Elas atuam como preenchimento hidrofílico, impedindo a agregação e o colapso da rede de celulose. Elas também são responsáveis pela porosidade da parede celular (Taiz & Zeiger 2006). Em folhas de *Brassica napus* mantidas a 2°C foi observado um retardo na expansão celular, concomitantemente com o desenvolvimento de uma resistência ao congelamento, atribuída principalmente ao aumento do conteúdo de pectinas na parede celular (Solecka *et al.* 2008). Estas modificações afetam o balanço de água e o padrão de formação do gelo nos tecidos das plantas (Kubacka-Zebalska & Kacperska 1999).

Outra alteração que pode ocorrer durante a adaptação ao frio é em relação ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Haldimann 1999, Carter & Knapp 2001). As plantas tendem a reduzir o conteúdo de clorofilas e aumentar a proporção de carotenoides, como foi observado para o milho (*Zea mays* L.) quando cultivado a 14°C (dia)/12°C (noite) e comparado ao tratamento de 24°C (dia)/22°C (noite) (Haldimann 1999). Este aumento na razão carotenoides: clorofilas é importante para a dissipação, em forma de calor, do excesso de energia absorvida pelas clorofilas, protegendo-as de danos fotooxidativos e facilitando a rápida retomada da fotossíntese com o aumento da temperatura (Gilmore & Ball 2000). Porém, para a bromélia *Vriesea inflata* não foram observadas diferenças entre o conteúdo de clorofilas e carotenoides em plantas *in vitro* crescidas a 15°C e comparadas com aquelas a 28°C (Pedroso *et al.* 2010).

As possíveis alterações nas plantas do ambiente *in vitro* podem facilitar a aclimatização, que é a etapa que visa a produção de mudas em estufas.

Aclimatização de plantas após cultivo *in vitro* sob baixas temperaturas

Um momento crucial para o sucesso do cultivo *in vitro* é a fase da aclimatização, ou seja, quando as plantas saem das condições *in vitro* e são transferidas para as condições *ex vitro*. O índice de sobrevivência para algumas espécies pode ser baixo nessa fase, tornando-se um grave problema na produção de plantas (Kadleček *et al.* 2001). Isto ocorre por causa das características do ambiente *in vitro* como baixa intensidade luminosa, condições assépticas, um meio nutritivo com fontes de carboidrato e nutrientes para permitir o seu crescimento e uma atmosfera com alto nível de umidade. Estas características contribuem para a indução de um fenótipo que pode não sobreviver nas condições ambientais de estufa ou campo (Hazarika 2006).

Existem relatos na literatura de que a exposição a baixas temperaturas seriam favoráveis ao retorno do crescimento das plantas durante a aclimatização (Pereira & Fortes

2000, Tadesse *et al.* 2000, Hoffmann *et al.* 2001, Negash *et al.* 2001, Malik *et al.* 2009, Lata *et al.* 2010). Plantas de *Rheum emodi* Wall. mantidas *in vitro* a 15°C apresentaram uma taxa de sobrevivência de 94% durante a aclimatização, enquanto aquelas mantidas a 25°C mostraram uma taxa de 80% (Malik *et al.* 2009). Para *Vriesea inflata*, a porcentagem de sobrevivência foi de 100%, independentemente da temperatura de cultivo *in vitro* prévia (15°C e 28°C) (Pedroso *et al.* 2010). Além de uma maior taxa de sobrevivência, as plantas podem também ser mais vigorosas, como demonstrado para macieira (*Malus prunifolia* Borkh.), que após o cultivo na temperatura de 4°C apresentou aumento na altura e na massa seca das raízes e parte aérea quando aclimatizadas em casa de vegetação (Pereira & Fortes 2000). As possíveis adaptações estruturais e metabólicas adquiridas durante o cultivo a baixa temperatura pode ter favorecido estas plantas no processo de transferência para as condições *ex vitro*.

Objetivos

O objetivo deste trabalho é identificar a condição de cultivo *in vitro*, sob temperatura baixa, que induza o menor crescimento possível, sem causar danos à plantas de *Nidularium minutum* Mez., possibilitando a aclimatização, visando a formação de uma coleção *in vitro* sob crescimento lento como estratégia de conservação.

Adicionalmente procurou-se investigar as possíveis adaptações anatômicas e fisiológicas dessas plantas cultivadas nos diferentes tratamentos térmicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aranda-Peres, A.N., Martinelli, A.P., Peres, L.E.P. & Higashi, E.N.** 2009. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: the importance of calcium. *HortScience* 44 (1): 106-112.
- Ávila-Díaz, I., Oyama, K., Gómez-Alonso, C. & Salgado-Garciglia, R.** 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 335-343.
- Benson, E.E.** 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27: 141-219.
- Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bisht, S., Bisht N.S. & Bhandari, S.** 2012. *In vitro* micropropagation in *Polygonatum verticillatum* (L.) All. an important threatened medicinal herb of Northern India. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18 (1): 89-93.
- Boese, S.R. & Huner, N.P.A.** 1990. Effect of growth temperature and temperature shifts on spinach leaf morphology and photosynthesis. *Plant Physiology* 94: 1830-1836.
- Camillo, J., Scherwinski-Pereira, J.E., Vieira, R.F. & Peixoto, J.R.** 2009. Conservação *in vitro* de *Cochlosperm regium* (Schrank) Pilg.-Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 11 (2): 184-189.
- Carneiro, L.A. & Mansur, E.** 2004. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. *Vidalia* 2 (1): 12-20.
- Carpita, N. & McCann, M.** 2000. The cell wall. *In*: B.B. Buchanan, W. Gruissem & R.L. Jones. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist, Rockville. pp. 53-107.
- Carter, G.A. & Knapp, A.K.** 2001. Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. *American Journal of Botany* 88 (4): 677-684.
- Crowe, J.H., Oliver, A.E., Hoekstra, F.A. & Crowe, L.M.** 1997. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. *Criobiology* 35: 20-30.
- Dumet, D., Engelmann, F., Chabrillange, N., Duval, Y. & Dereuddre, J.** 1993. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *Cryo-Letters* 14: 243-250.

- Engelmann, F.** 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cellular & Development Biology — Plant* 47: 5-16.
- Evans, D.E., Coleman, J.O.D. & Kearns, A.** 2003. Plant Cell Culture. BIOS Scientific Publishers, London.
- Fay, M.F.** 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In vitro Cellular & Development Biology – Plant* 28: 1-4.
- Fortes, G.R.L. & Pereira, J.E.S.** 2001. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36 (10): 1261-1264.
- Galindo-Leal, C. & Câmara, I.G.** 2005. *Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: C. Galindo-Leal & I.G. Câmara (eds.). Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas.* Belo Horizonte, Conservação Internacional. pp. 3-11.
- George, E.F.** 1993. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. London, Exegetics.
- Gilmore, A.M. & Ball, M.C.** 2000. Protection and storage of chlorophyll in overwintering evergreens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (20): 11098-11101.
- Givnish, T.J., Millam, K.C., Berry, P.E. & Sytsma, K.J.** 2007. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso* 23: 3-26.
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Van E. B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, A.C., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E. & Sytsma, K.J.** 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98 (5): 1-24.
- Gonçalves, S. & Romano, A.** 2007. *In vitro* minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum*. *Biologia Plantarum* 51 (4): 795-798.
- Gutjahr, M.R. & Tavares, R.** 2009. Clima. *In: M.I.M.S. Lopes, M. Kirizawa & M.M.R.F. Melo (orgs.). Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba.* Instituto de Botânica, São Paulo. pp. 39-51.
- Guy, C.L., Huber, J.L.A. & Huber, S.C.** 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiology* 100: 502-508.
- Haldimann, P.** 1999. How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in sensitivity to low temperature? *Journal of Experimental Botany* 50 (333): 543-550.
- Hao, Y. & Deng, X.** 2003. Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 253-260.

- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies Jr., F.T. & Geneve, R.L.** 2002. Plant propagation: principles and practices. 7 ed. Upper Saddle River, New Jersey.
- Hazarika, B.N.** 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108: 105-120.
- Hoffmann, A., Chalfun, N.N.J. & Pasqual, M.** 2001. Efeito do ácido giberélico e do frio na sobrevivência e crescimento inicial de plântulas micropropagadas de macieira “Marubakaido”, durante a aclimatização. *Ciência e Agrotecnologia* 25 (1): 31-37.
- Islam, M.T., Dembele, D.P. & Keller, E.R.J.** 2005. Influence of the explant, temperature and different culture vessels on *in vitro* culture for germplasm maintenance of four mint accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 123-130.
- Kadleček, P., Tichá, I., Haisel, D., Čapková, V. & Schäfer, C.** 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161: 695-701.
- Kubacka-Zebalska, M. & Kacperska, A.** 1999. Low temperature-induced modifications of cell wall content and polysaccharide composition in leaves of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.). *Plant Science* 148: 59-67.
- Larcher, W.** 2006. *Ecofisiologia vegetal*. Rima, São Carlos.
- Lata, H., Moraes, R.M., Bertoni, B., Pereira, A.M.S.** 2010. *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. *In vitro Cellular & Development Biology – Plant* 46: 22-27.
- Leme, E.M.C. & Marigo, L.C.** 1993. *Bromélias na natureza*. Marigo Comunicação Visual, Rio de Janeiro.
- Lemos, E.E.P., Ferreira, M.S., Alencar, L.M.C., Ramalho, C.E. & Albuquerque, M.M.** 2002. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37 (10): 1359-1364.
- Lima-Brito, A., Albuquerque, M.M.S., Alvim, B.F.M., Resende, S.V., Bellintani, M.C. & Santana, J.R.F.** 2011. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. *Ciência Rural* 41 (8): 1354-1361.
- Luther, H.E.** 2010. *An alphabetical list of bromeliad binomials*. 12 ed. Sarasota Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota.
- Majada, J.P., Tadeo, F., Fal, M.A. & Sánchez-Tamés, R.** 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 207-214.
- Malik, S., Kumar, R., Vats, S.K., Brushan, S., Sharma, M. & Ahuja, P.S.** 2009. Regeneration in *Rheum emodi* Wall.: A step towards conservation of an endangered medicinal plant species. *Engineering in Life Sciences* 9 (2): 130-134.

- Mamede, M.C.H., Souza, V.C., Prado, J., Barros, F., Wanderley, M.G.L. & Rando, J.G.** 2007. Livro Vermelho das Espécies Vegetais Ameaçadas de Extinção no Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo.
- Mollo, L., Martins, M.C.M., Oliveira, V.F., Nievola, C.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2011. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 107 (1): 141-149.
- Negash, A., Krens, F., Schaart, J. & Visser, B.** 2001. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 66: 107-111.
- Nievola, C.C., Kraus, J.E., Freschi, L., Souza, B.M. & Mercier, H.** 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets growth *in vitro*. *In vitro Cellular & Development Biology – Plant* 41: 832-837.
- Nunes, E.C., Castilho, C.V., Moreno, F.N. & Viana, A.M.** 2002. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: 259-268.
- Nunes, J.V.C.** 2006. Bromélias. *In*: L.L. Simões & C.F. Lino. Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais. 2.ed. São Paulo, Senac. pp. 119-132.
- Pedroso, A.N.V., Lazarini, R.A.M., Tamaki, V. & Nievola, C.C.** 2010. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. Revista Brasileira de Botânica 33 (3): 407-414.
- Pence, V.C.** 2011. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. Kew Bulletin 65: 1-9.
- Pereira, A.R., Pereira, T.S., Rodrigues, A.S. & Andrade, A.C.S.** 2008. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. Acta Botanica Brasilica 22 (4): 1150-1162.
- Pereira, J.E.S. & Fortes, G.R.L.** 2000. Desfolheamento e baixa temperatura em plantas micropropagadas de macieira como forma de superar a parada do crescimento durante a aclimatização. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12 (2): 135-145.
- Pierik, R.L.M.** 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Prathanturug, S., Rungthipwan, P., Jenjittikul, T., Chuakul, W. & Saralamp, P.** 2012. *In vitro* propagation of *Stemona hutanguriana* W. Chuakul, an endangered medicinal plant. Physiology and Molecular Biology of Plants 18 (3): 281-286.
- Rao, N.K.** 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology 3 (2): 136-145.

- Renau-Morata, B., Arrillaga, I & Segura, J.** 2006. *In vitro* storage of cedar shoot cultures under minimal growth conditions. *Plant Cell Reports* 25: 636-642.
- 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 Cellular & Development Biology – Plant* 46 (6): 524-529.
- Santos, R.I.** 2000. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12 (Edição especial): 70-84.
- Sarmast, M.K., Salehi, H. & Khosh-Khui, M.** 2012. Micropropagation of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca* Carrière from orthotropic stem explants. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18 (3): 265-271.
- Sasaki, H., Ichimura, K. & Oda, M.** 1996. Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of cabbage seedlings. *Annals of Botany* 78: 365-369.
- Solecka, D., Zebrowski, J. & Kacperska, A.** 2008. Are pectins involved in cold acclimation and de-acclimation of winter oil-seed rape plants? *Annals of Botany* 101: 521-530.
- Souza, A.S., Souza, F.V.D., Santos-Serejo, J.A., Junghans, T.G., Paz, O.P., Montarroyos, A.V.V., Santos, V.S. & Morais, L.S.** 2009. Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca. Circular Técnica EMBRAPA Cruz das Almas – BA 90: 1-24.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H.** 2005. *Botânica Sistemática – guia ilustrado para identificação as famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.* Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Stefanowska, M., Kuras, M., Kubacka-Zebalska, M. & Kacperska, A.** 1999. Low temperature affects patterns of leaf growth and structure of cell walls in winter oilseed rape (*Brassica napus* L., var. *oleifera* L.). *Annals of Botany* 84: 313-319.
- Tadesse, M., Lommen, W.J.M. & Struik, P.C.** 2000. Effects of *in vitro* treatments on leaf area growth of potato transplants during acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ culture* 61: 59-67.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2006. *Fisiologia Vegetal.* 3 ed. Artmed, Porto Alegre.
- Tavares, A.R. & Barros, F.** 2009. Plantas com potencial ornamental. *In: M.I.M.S. Lopes, M. Kirizawa & M.M.R.F. Melo (orgs.). Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba.* Instituto de Botânica, São Paulo. pp. 441-470.
- Vieira, M.L.C.** 2000. Conservação de germoplasma *in vitro*. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* 14: 18-20.

- Withers, L.A.** 1985. Cryopreservation and storage of germplasm. *In*: R.A., Dixon (ed.). Plant cell culture: a practical approach. Oxford, Irl Press. pp. 169-191.
- Wolf, S., Hématy, K. & Höfte, H.** 2012. Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 63: 381-407.
- Yuanyuan, M., Yali, Z., Jiang, L. & Hongbo, S.** 2009. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *African Journal of Biotechnology* 8 (10): 2004-2010.

Capítulo 1

Efeito da baixa temperatura no crescimento, anatomia e conteúdo de carboidratos na bromélia endêmica *Nidularium minutum* Mez. cultivada *in vitro*

RESUMO

O cultivo *in vitro* pode ser utilizado para preservação, sendo que através dele é possível formar uma coleção de plantas de crescimento lento utilizando baixas temperaturas, de modo a diminuir a necessidade de subcultivos e custos com manutenção. Contudo, essa redução não deve alterar os processos de desenvolvimento das plantas, sendo necessária a avaliação das respostas fisiológicas e morfológicas envolvidas na adaptação ao frio, sobretudo quando se trata de uma espécie tropical como é o caso da bromélia endêmica, ameaçada de extinção, *Nidularium minutum* Mez. O objetivo deste trabalho é identificar a condição de cultivo *in vitro*, em baixa temperatura, que induza o menor crescimento de plantas de *N. minutum* visando criar subsídios para a formação de uma coleção *in vitro* de crescimento lento. Plantas de *N. minutum* germinadas *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) com a metade da concentração dos macronutrientes foram transferidas para câmaras de germinação nas temperaturas de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C e 25°C. Após três e seis meses foram avaliados parâmetros biométricos, anatômicos, pigmentos fotossintéticos e conteúdo de carboidratos da folha. As plantas mantidas a 5°C não sobreviveram, enquanto que as demais apresentaram uma alta porcentagem de sobrevivência após seis meses de cultivo *in vitro*. Observou-se redução do crescimento nas plantas mantidas nas temperaturas baixas (10 e 15°C) em relação àquelas cultivadas a 25°C. Foi observada uma coloração verde clara nas folhas das plantas cultivadas a 10°C e 15°C, sendo que após seis meses as plantas mantidas a 15°C não apresentavam mais esse aspecto, o que foi correlacionado ao aumento do conteúdo de clorofila após esse período. As plantas crescidas a 10 e 15°C tinham parênquima aquífero mais espesso e maior quantidade de açúcares que aquelas mantidas a 25°C. Destaca-se o aumento nos monossacarídeos comumente encontrados em pectinas naquelas mantidas a 10°C. Essas características foram associadas à conservação de água, como uma resposta dessa espécie ao frio. Deste modo, as temperaturas de 10 e 15°C podem ser utilizadas para formação de uma coleção *in vitro* de crescimento lento desta espécie.

Palavras-chave: Bromeliaceae, subcultivos, clorofila, coleção *in vitro* de crescimento lento, preservação.

Effect of low temperature on growth, anatomy and carbohydrate content in endemic bromeliad *Nidularium minutum* Mez. cultured *in vitro*

ABSTRACT

The *in vitro* culture can be used for preservation and with the use of low temperatures it is possible to form a slow growth collection of plants, which reduces the need for subculture and maintenance costs. However, this reduction should not change the processes of plant development, becoming necessary to evaluate the morphological and physiological responses involved in adaptation to cold, especially when it comes to a tropical species such as the endemic and endangered bromeliad *Nidularium minutum* Mez. The aim of this work is to identify the *in vitro* condition, at low temperature, which induces lower growth of *N. minutum* plants in order to create subsidies for the formation of an *in vitro* collection under slow growth conditions. Plants of *N. minutum* germinated *in vitro* on Murashige & Skoog (1962) with half the concentration of macronutrients were transferred to germination chambers at temperatures of 5°C, 10°C, 15°C, 20°C and 25°C. After three and six months biometric and anatomical parameters, photosynthetic pigments and carbohydrate content of the leaf were evaluated. Plants maintained at 5°C did not survive, while the others showed a high survival rate after six months of *in vitro* culture. It was observed a growth reduction in plants grown at low temperatures (10 to 15°C) compared to those grown at 25°C. We observed light green colored leaves of plants grown at 10°C and 15°C, and after six months the plants kept at 15°C did not show this aspect, which was correlated with increased chlorophyll content thereafter. Plants grown at 10 and 15°C had thicker parenchyma and higher sugar content than those kept at 25°C. A noteworthy result was the increase of monosaccharides commonly found in pectins on those kept at 10°C. These characteristics were associated with water conservation, as a response to cold in this species. Thus, temperatures of 10 and 15°C may be used for forming an *in vitro* collection of slow growth of this species.

Keywords: Bromeliaceae, subcultures, chlorophyll, *in vitro* collection of slow growth, preservation.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* de bromélias tem sido utilizado como uma estratégia eficiente para se propagar material genético de espécies ameaçadas, visando assegurar a sobrevivência, em longo prazo, desse material na natureza (Mercier & Nievola 2003). É uma técnica que vem sendo utilizada para a conservação de espécies ameaçadas e a tendência é que seu uso seja ampliado para um maior número de plantas, já que cada vez mais espécies estão em risco de extinção (Sarasan *et al.* 2006). Segundo Vieira (2000) e Carneiro & Mansur (2004), por meio da micropropagação é possível manter coleções de plantas, reduzindo-se o crescimento destas na condição *in vitro*, sem prejudicar o seu desenvolvimento e aumentando ao máximo o intervalo dos subcultivos sem afetar a viabilidade das plantas. Esta metodologia pode contribuir para a formação de um banco de germoplasma constituído por sementes de várias populações da mesma espécie, garantindo a variabilidade genotípica necessária a programas de conservação, aplicáveis a espécies ameaçadas de extinção, como é o caso de *Nidularium minutum* Mez.

A bromélia *N. minutum* apresenta um potencial valor como planta ornamental devido a sua folhagem e flores. Esta espécie é endêmica da Serra de Paranapiacaba, localizada no Estado de São Paulo, região que abriga a Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. O crescente desmatamento e a ocorrência do extrativismo seletivo, que no caso das bromélias ocorre por causa do valor comercial que muitas espécies apresentam (Pereira *et al.* 2008) pode levar a extinção de várias espécies, sendo que *N. minutum* além de endêmica, consta como vulnerável na Lista publicada no Livro Vermelho das Espécies Vegetais Ameaçadas de Extinção (Mamede *et al.* 2007). Logo, medidas de conservação para esta espécie são necessárias.

Um dos principais métodos para se produzir uma coleção *in vitro* de crescimento lento é a redução da temperatura, já que a temperatura tem sido considerada o fator ambiental mais importante, sendo que a adaptação rápida às alterações ambientais é uma característica crucial para garantir a sobrevivência das plantas (Browse & Xin 2001, Sharma *et al.* 2005).

As espécies tropicais são geralmente sensíveis ao frio e devem ser armazenadas em temperaturas acima de 10°C para evitar a ocorrência de injúrias (Rao 2004, Benson 2008). O uso de 15°C foi eficaz para a formação da coleção *in vitro* de crescimento lento das bromélias *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra (Pedroso *et al.* 2010) e *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Mollo *et al.* 2011). Entretanto, não foram encontrados trabalhos sobre o cultivo *in vitro* de *N. minutum* em baixas temperaturas.

A exposição das plantas a baixas temperaturas pode levar a mudanças morfológicas e fisiológicas, principalmente para plantas tropicais, como é o caso de *N. minutum*. Uma das adaptações mais frequentes é o aumento na espessura das folhas, em geral relacionada ao aumento do parênquima (Boese & Huner 1990, Gursuch *et al.* 2010). Em plantas de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. Smooth Cayenne) cultivadas *in vitro* foi observado um aumento na espessura foliar associada ao aumento nas camadas do parênquima clorofiliano, além da presença de um sistema vascular mais conspícuo nas plantas mantidas a 28°C (dia)/15°C (noite) em relação aquelas cultivadas a 28°C constante (Nievola *et al.* 2005). Essa adaptação pode estar relacionada com a manutenção do teor hídrico das plantas quando submetidas a baixas temperaturas, pois conforme diminui a temperatura, a velocidade das reações químicas também diminui. Consequentemente, menos energia metabólica está disponível, levando à restrição na absorção de água e nutrientes (Larcher 2006). Para *Rheum emodi* Wall., uma erva medicinal da Índia, também foi relatado o papel da conservação de água em plantas cultivadas *in vitro* sob baixas temperaturas (Malik *et al.* 2009). Foi observado um aumento no número de feixes vasculares nas plantas mantidas a 15°C quando comparadas com aquelas crescidas a 25°C, o que pode favorecer o transporte de água e outros nutrientes.

A adaptação ao frio pode estar associada ao acúmulo de carboidratos como sacarose, glucose, frutose e oligossacarídeos da série da rafinose (Yuanyuan *et al.* 2009). Mollo *et al.* (2011) verificaram o aumento do conteúdo de *myo*-inositol, glucose, frutose e sacarose na bromélia imperial *Alcantarea imperialis* quando cultivada *in vitro* a 15°C em relação àquela cultivada a 30°C. Os autores atribuíram esse efeito à existência da temperatura baixa. Resultados similares foram encontrados na análise de folhas de repolho (*Brassica oleracea* cv. Banchurisou) (Sasaki *et al.* 1996) cultivadas a 5°C (Guy *et al.* 1992), sendo que conforme foi se prolongando o tempo de exposição, o teor de açúcar e a tolerância ao frio foram aumentando.

Paralelamente às alterações nos conteúdos de açúcares solúveis, variações na deposição de carboidratos de parede celular também têm sido relatadas durante a exposição ao frio (Weiser *et al.* 1990, Kubacka-Zebalska & Kacperska 1999). A parede celular de folhas de ervilha cultivadas a 2°C apresentou um aumento no conteúdo de polissacarídeos pécticos se comparados a plantas mantidas a 22°C (Weiser *et al.* 1990). Do mesmo modo, em folhas de *Brassica napus* L. var. *oleifera* L. houve este aumento quando submetidas a 2°C, sendo que o ácido urônico foi o componente mais abundante (Kubacka-Zebalska & Kacperska 1999). Estas modificações na parede celular indica uma importante reorganização estrutural durante a aclimatização ao frio.

Além dos carboidratos, variações na temperatura também podem alterar o conteúdo endógeno de clorofila (Carter & Knapp 2001). Em *Pinus ponderosa*, a aclimatização ao inverno envolve menor capacidade fotossintética e aumento da taxa de carotenoides em relação a clorofilas (Verhoeven *et al.* 1999). Para a bromélia *Vriesea inflata*, cultivada *in vitro* nas temperaturas de 15°C e 28°C, não foram observadas diferenças em relação ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos entre os tratamentos (Pedroso *et al.* 2010).

N. minutum habita uma região com uma temperatura média ao redor de 21°C no verão e 15°C no inverno (Gutjahr & Tavares 2009), por isso acredita-se ser possível a formação de uma coleção *in vitro* desta espécie com a redução da temperatura. Embora a literatura apresente relatos sobre a ocupação do ambiente frio pelas bromélias (Benzing 2000), há poucos estudos básicos sobre a plasticidade dessas plantas em relação a variações de temperatura. Desse modo, estudos relativos ao cultivo e manutenção de bromélias em baixas temperaturas podem trazer informações sobre o comportamento fisiológico dessas plantas e facilitar o estabelecimento de condições que permitam seu cultivo em temperaturas sub-ótimas, visando sua conversação *ex situ*. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho é identificar a condição de cultivo *in vitro*, em temperatura baixa, que induza o menor crescimento possível de plantas de *Nidularium minutum* Mez. visando a formação de uma coleção *in vitro* sob crescimento lento como estratégia de conservação. Adicionalmente procurou-se investigar as possíveis adaptações anatômicas e fisiológicas dessas plantas cultivadas nos diferentes tratamentos térmicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de *Nidularium minutum* Mez. coletadas na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba – SP (Figura 1). Para evitar a retirada excessiva de frutos, uma vez que essa espécie está ameaçada de extinção, foram coletados apenas os frutos de três agrupamentos dos vários encontrados ao longo das trilhas existentes no local, não se retirando todos os frutos existentes, visando, também, a preservação *in situ*.



Figura 1. Indivíduo adulto de *Nidularium minutum* Mez. em seu habitat natural na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba – SP.

2.2. Estabelecimento do cultivo *in vitro* de *N. minutum* em diferentes temperaturas

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

As sementes foram submetidas à desinfestação superficial em frasco contendo álcool etílico a 70% por cinco minutos, sendo, em seguida, imersas em solução do fungicida benomyl 0,1% por 15 minutos e, posteriormente, colocadas em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2%, acrescida de duas gotas de Tween 20[®], durante uma hora, em agitação. Foram depositadas 100 sementes por placa de Petri contendo 20 mL do meio de cultura Murashige & Skoog (1962-MS) na concentração de 50% da composição original dos

macronutrientes, mantendo-se a concentração de micronutrientes, acrescidos de 3% de sacarose, 0,01% de *myo*-inositol e 0,01% de tiamina HCl. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de 5 gL⁻¹ de ágar e a sua esterilização foi realizada a 121°C, durante 15 minutos. As sementes foram mantidas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas, irradiância de 30 μmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 25 ± 2°C por 30 dias (Figura 2A). Foram utilizadas aproximadamente 5000 sementes.

Após o período de trinta dias (Figura 2B), as plantas foram avaliadas quanto ao número de folhas e raízes, comprimento das folhas e raízes, antes de serem transferidas para os diferentes tratamentos térmicos (Tempo zero). Foram colocadas cinco plantas por frasco e estes distribuídos em cinco câmaras de germinação nas temperaturas de 5 ± 2°C, 10 ± 2°C, 15 ± 2°C, 20 ± 2°C e 25 ± 2°C (sendo esta última temperatura considerada o controle), com fotoperíodo de 12 horas e irradiância média de 45 μmol m⁻² s⁻¹. Foram utilizados 150 frascos por tratamento (Figura 2C). Utilizou-se o mesmo meio de cultura descrito anteriormente.

A cada três meses as plantas foram transferidas para novo meio de cultura, com objetivo de não haver deficiência nutricional no período de cultivo.

A figura 3 mostra um fluxograma indicando as etapas do cultivo *in vitro* em diferentes temperaturas.

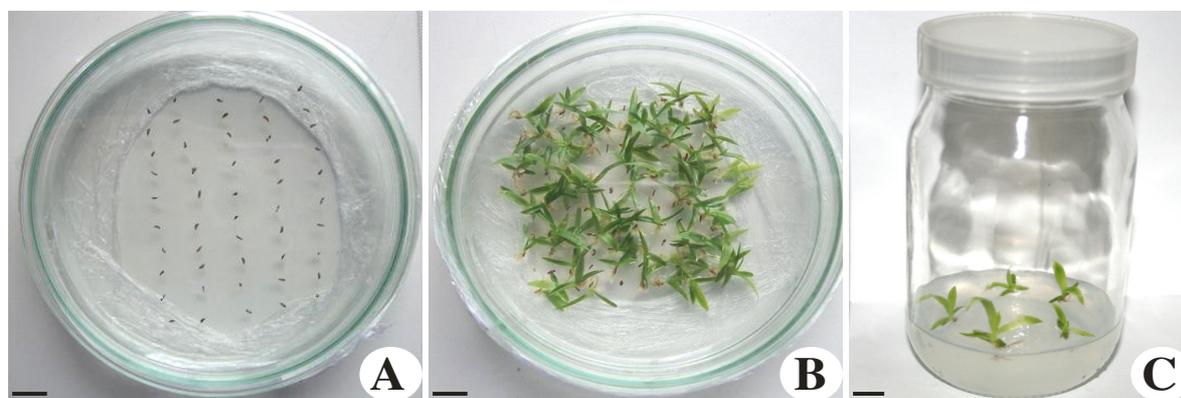


Figura 2. Cultivo *in vitro* de *Nidularium minutum*. (A) Sementes cultivadas na placa de Petri a 25°C. (B) Plantas após 30 dias de cultivo na placa de Petri. (C) Frasco com plantas após 30 dias de cultivo (Tempo Zero). Barra = 1,0 cm.

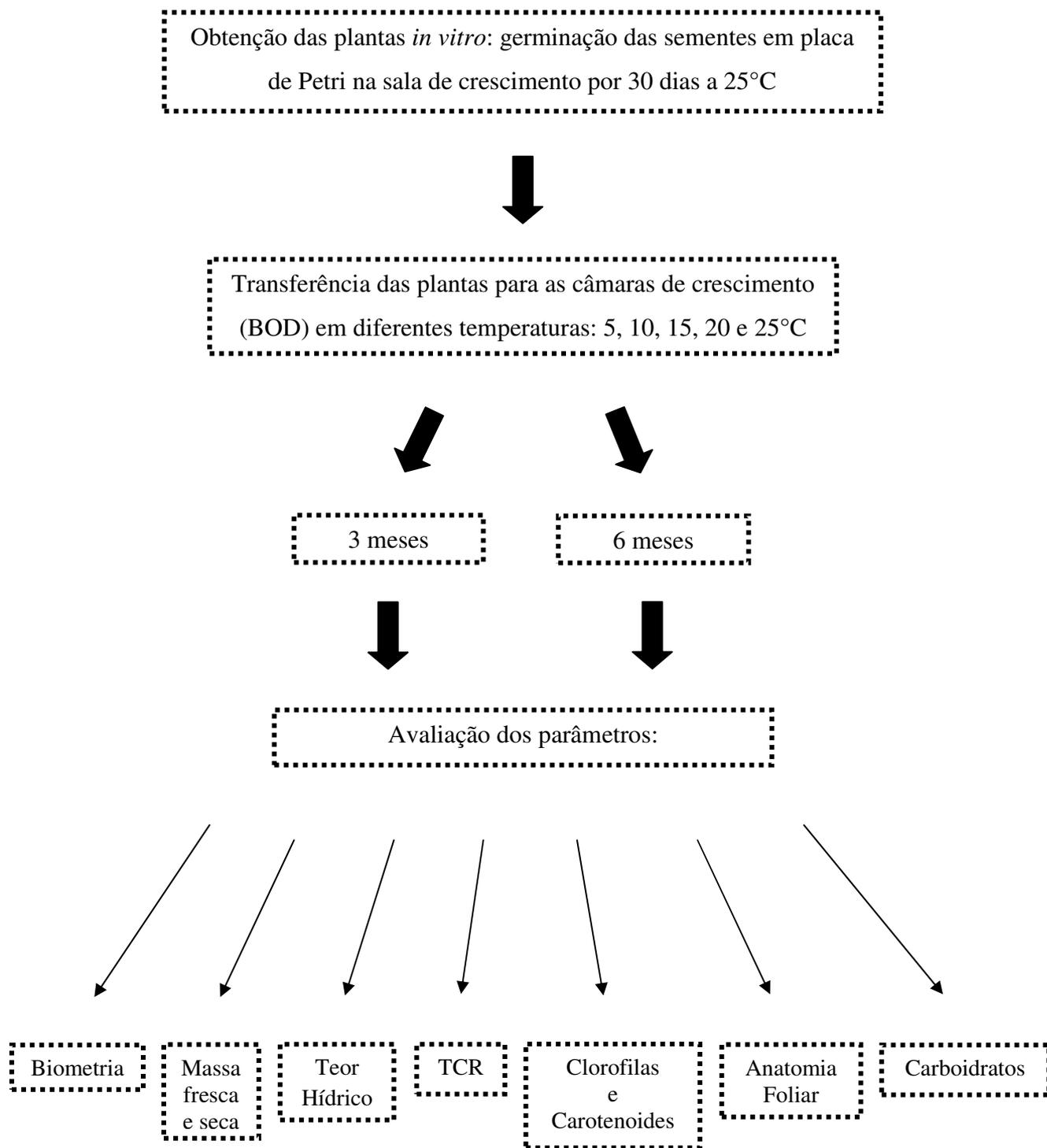


Figura 3. Fluxograma das etapas de cultivo *in vitro* de *Nidularium minutum* em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20 e 25°C – Controle).

2.3. Parâmetros avaliados

2.3.1. Porcentagem de sobrevivência

Para determinar a sobrevivência, aos três e seis meses foi feito o cálculo da porcentagem de sobrevivência das plantas submetidas a diferentes temperaturas.

2.3.2. Análise biométrica

Nesta análise foram avaliadas 20 plantas, coletadas aos três e seis meses de cada tratamento térmico, quanto ao número de raízes e folhas e, também, quanto ao comprimento da raiz mais longa e da folha mais longa.

2.3.3. Determinação de massa

Aos três e seis meses, retiraram-se, ao acaso, plantas provenientes das diferentes temperaturas estudadas para a determinação da massa fresca e seca. O número de plantas (de 1 a 80) variou de acordo com a dimensão das mesmas, uma vez que foi considerado 0,1 g de massa fresca como quantidade mínima para cada amostra. As plantas foram separadas em parte aérea e raiz, utilizando-se três amostras compostas para cada coleta. As medidas de massa seca foram realizadas após secagem em estufa a 60°C até massa constante.

A partir dos dados de massa seca, foi determinada a partição da biomassa entre parte aérea e raiz, segundo a equação:

$$\text{Partição da biomassa} = \frac{\text{massa seca do órgão} \times 100}{\text{massa seca total da planta}}$$

2.3.4. Teor hídrico

A partir dos dados de massa fresca e seca foi possível calcular a quantidade de água (em porcentagem) nas plantas submetidas por três e seis meses aos diferentes tratamentos térmicos. A equação utilizada foi:

$$\text{Teor hídrico} = \frac{\text{massa fresca} - \text{massa seca}}{\text{massa fresca}} \times 100$$

2.4. Taxa de Crescimento Relativo

A Taxa de Crescimento Relativo (TCR) é a variação ou incremento em massa, altura, número de folhas, ou qualquer outro parâmetro de avaliação de crescimento, ao longo de um determinado período, estando diretamente relacionado ao valor alcançado no período anterior (Benincasa 2003). Foram utilizados os dados de número, comprimento e massa seca de folhas e raízes das plantas cultivadas *in vitro* para os cálculos das TCR.

A equação utilizada foi:

$$TCR = [(LnP_2 - LnP_1)] (t_2 - t_1)^{-1}$$

Onde:

Ln é o logaritmo natural, P_2 é o valor atual do parâmetro, P_1 é o valor anterior do parâmetro e t é o tempo (índice $_1$ = valor inicial e índice $_2$ = valor final).

2.5. Determinação do teor de clorofila e de carotenoides

Amostras compostas de folhas provenientes de cada tratamento térmico, aos três e seis meses, foram congeladas a $-20^{\circ}C$ para a quantificação de clorofilas e de carotenoides, segundo técnica descrita por Lichtenthaler (1987), utilizando-se três amostras para cada coleta. O material vegetal congelado foi macerado em acetona pura gelada e filtrado em papel, sendo o filtrado coletado em balão volumétrico de 25 mL. A acetona pura foi adicionada sobre o macerado, no papel de filtro, até atingir a brancura. O volume do balão foi completado com acetona pura para 25 mL. As absorbâncias das clorofilas foram lidas a 662 e 645 nm (clorofilas a e b, respectivamente) e a dos carotenoides a 470 nm. As concentrações dos pigmentos foram determinadas de acordo com as equações definidas em Lichtenthaler (1987). A partir desses dados, foi determinada a razão carotenoides: clorofilas, segundo a equação:

$$\text{Razão carotenoides: clorofilas} = \frac{\text{conteúdo de carotenoides}}{\text{conteúdo de clorofila a + b}}$$

2.6. Análise estrutural

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Anatomia do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

2.6.1. Anatomia foliar de plantas adultas

Foram utilizadas amostras de folhas adultas, expandidas, retiradas da quarta folha de indivíduos provenientes da casa de vegetação do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica de São Paulo. Amostras da porção mediana da lâmina foliar foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965), levadas a uma bomba de vácuo para retirada do ar contido nos tecidos e armazenadas em etanol 70%. As folhas foram seccionadas, transversalmente, à mão livre, com auxílio de lâmina de barbear e isopor. As

secções foram clarificadas com solução de hipoclorito de sódio a 20%, coradas com azul de Astra 0,5% com ácido tartárico 2% e safranina 1%, desidratadas pela série etílica e as lâminas permanentes foram montadas com resina sintética.

A captura de imagens digitais dos materiais preparados em lâminas foi realizada ao microscópio Zeiss Primo Star equipado com câmera digital Canon Power Shot A650 IS. As escalas micrométricas foram obtidas nas mesmas condições ópticas que foram utilizadas.

2.6.2. Anatomia foliar de plantas cultivadas *in vitro*

Os estudos foram realizados em três plantas de cada tratamento térmico, utilizando-se a quarta folha a partir do ápice. Amostras da região do terço médio da lâmina foliar foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965), levadas a uma bomba de vácuo para retirada do ar contido nos tecidos e armazenadas em etanol 70%. Posteriormente, foram desidratadas até etanol 100%, infiltradas e incluídas em resina plástica (Leica HistoResin[®]). Os blocos obtidos foram seccionados transversalmente (7 µm de espessura) em micrótomo rotatório (Olympus CUT 4055). Os cortes foram corados com azul de toluidina 0,05% (Sakai 1973) em tampão fosfato e ácido cítrico (McIlvaine 1921) pH 4,5 e as lâminas permanentes foram montadas com resina sintética.

A captura de imagens digitais dos materiais preparados em lâminas foi realizada ao microscópio Zeiss Primo Star equipado com câmera digital Canon Power Shot A650 IS ou ao microscópio Leica DM LB equipado com câmera de vídeo Leica DC 300F. As escalas micrométricas foram obtidas nas mesmas condições ópticas que foram utilizadas.

Foram realizadas medições das seguintes variáveis da lâmina foliar em secção transversal: espessura da epiderme (face adaxial e abaxial) e mesofilo (total, parênquima aquífero e clorofiliano) utilizando o software de análise de imagens ANATI QUANTI 2.0[®].

2.7. Análise de carboidratos

Essas análises foram realizadas no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

Para a extração dos açúcares solúveis, amostras da parte aérea (de 1 a 10 g de massa fresca) foram maceradas em nitrogênio líquido e fervidas em etanol a 80% (25 mL por g de massa fresca) por 5 minutos. Os extratos foram centrifugados a 2000 rpm por 15 minutos a 20°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e reservados e três novas extrações foram realizadas com o resíduo, sendo duas em etanol 80% (12 mL por g de massa fresca) e a última feita com água destilada a temperatura ambiente. Os sobrenadantes das extrações foram reunidos, concentrados em evaporador rotatório para eliminação do etanol até aproximadamente 50 mL e mantidos em congelador a -20°C. Os resíduos foram congelados, liofilizados e pesados.

Os extratos etanólicos foram utilizados para as análises quantitativas e qualitativas de açúcares solúveis por métodos colorimétricos (item 2.7.1) e por cromatografia líquida de alto desempenho (item 2.7.2), respectivamente. Já os resíduos foram utilizados para as análises de amido (item 2.7.3) e composição da parede celular (item 2.7.4).

2.7.1. Quantificação de carboidratos solúveis

Os açúcares totais e redutores presentes nos extratos etanólicos foram quantificados, respectivamente, pelos métodos do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956) e de Somogyi-Nelson (Somogyi 1945), utilizando glucose (100 µg/mL) como padrão.

2.7.2. Análise de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD)

Foi utilizado 1,0 mL de cada amostra do extrato etanólico, após evaporação do álcool, para a purificação em colunas de troca iônica, utilizando-se as resinas catiônica Dowex 50x8 (100-200 mesh) e aniônica Dowex 1x8 (52-100 mesh). A eluição dos açúcares foi feita com água deionizada, utilizando-se 25 vezes o volume inicial da amostra. As amostras recolhidas das colunas de troca iônica tiveram seu pH ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (0,4M). Na sequência, as amostras foram liofilizadas e ressuspensas em 2,0 mL de água deionizada e filtradas em filtro Millipore 0,45 µm. A dosagem de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico (item 2.7.1) foi realizada para ajustar a concentração de cada amostra para 400 µg de açúcar/mL para posterior análise por cromatografia líquida de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em coluna Carbo-Pac PA1 e sistema Dionex ICS 3000. Os mono- e oligossacarídeos neutros foram eluídos isocraticamente com NaOH 100 mM, com fluxo de 0,25 mL min⁻¹ e identificados por comparação dos tempos de eluição com padrões comerciais de *myo*-inositol, glucose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose.

2.7.3. Dosagem de amido

A dosagem de amido foi realizada por meio de digestão enzimática, utilizando alíquotas de 5 ou 10 mg de cada resíduo liofilizado após extração com etanol, seguindo protocolo publicado por Amaral *et al.* (2007). A quantificação dos produtos da hidrólise enzimática foi realizada utilizando-se as enzimas glucose-oxidase e peroxidase (GOD-POD) e os reagentes 4-aminoantipirina e fenol em microplaca de Elisa para a leitura a 490 nm. A curva padrão foi construída a partir de quantidades crescentes de glucose na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

2.7.4. Extração da parede celular

Após a extração com etanol (item 2.7), foi separado do resíduo uma alíquota de 5 mg de cada amostra. Para a eliminação do amido, foi realizada a digestão enzimática com

amiloglucosidase diluída em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 (na proporção de 1 unidade da enzima para cada 10 mg de material) por 24 horas a 30°C. Após este período, o material foi lavado com água destilada, centrifugado (15 minutos, 13.000 rpm) e o sobrenadante desprezado, sendo o resíduo armazenado em estufa a 60°C para secagem, sendo posteriormente submetido a várias lavagens: tampão fosfato de potássio 0,5 M, pH 7,0, por três vezes; clorofórmio/metanol (v/v) por cinco vezes; acetona por três vezes e uma com éter etílico. Todas as lavagens foram realizadas com 1,0 mL de cada solvente por amostra. Após esta etapa, os resíduos de cada material foram lavados com água destilada e secos em estufa a 60°C para posterior pesagem e obtenção do rendimento da parede celular.

2.7.4.1. Hidrólise ácida e quantificação de açúcares

Uma alíquota de dois miligramas da parede celular bruta de cada amostra foi colocada em ampola de vidro e a elas adicionada 1,0 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 2N. As ampolas foram seladas em bico de Bunsen e o material foi hidrolisado em autoclave a 121°C, 1,5 atm por 1 hora. Os hidrolisados resultantes foram evaporados em aparelho “speed vac”, lavados com 500 µL de etanol, e novamente evaporados, sendo este procedimento repetido por mais duas vezes até completa eliminação do ácido. O material foi retomado em 1,0 mL de água deionizada e foram feitas dosagens de açúcares totais, conforme descrito anteriormente (item 2.7.1), e de ácidos urônicos livres ou ligados utilizando-se o método do *m*-hidroxibifenil (Filisetti-Cozzi & Carpita 1991), tendo ácido galacturônico (100 µg/mL) como padrão. Na sequência, foi feito o ajuste na concentração de cada amostra para 400 µg de açúcar/mL para a análise por cromatografia líquida de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em coluna Carbo-Pac PA1 e sistema Dionex ICS 3000. Os monossacarídeos foram eluídos isocriticamente em NaOH 16 mM, com fluxo de 0,25 mL min⁻¹, sendo identificados por comparação dos tempos de eluição com padrões comerciais de fucose, ramnose, arabinose, galactose, glucose, xilose e manose.

2.8. Delineamento estatístico

O delineamento experimental foi totalmente casualizado, havendo cinco tratamentos *in vitro* (5, 10, 15, 20 e 25°C). Para isso, foram utilizados cerca de 70 frascos com cinco plantas cada, avaliados aos três e seis meses. As médias dos dados biométricos, massa, quantificação anatômica, teor de clorofila e carboidratos solúveis e estruturais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização das plantas de *Nidularium minutum* antes de serem transferidas para os diferentes tratamentos térmicos (Tempo zero)

Plantas cultivadas por 30 dias em Sala de Cultura na temperatura de 25°C (Tempo zero) (Figura 4) apresentaram uma média de $2,4 \pm 0,50$ folhas com $1,1 \pm 0,15$ cm de comprimento, sendo o valor médio da massa fresca da parte aérea de $7,0 \pm 1,73$ mg e a seca de $0,5 \pm 0,06$ mg. Já para o sistema radicular, a média do número de raízes foi de $3,2 \pm 0,41$, comprimento de $0,4 \pm 0,11$ cm e massa fresca de $0,8 \pm 0,02$ mg e seca de $0,2 \pm 0,01$ mg.

Em relação ao teor de pigmentos fotossintetizantes, as plantas do Tempo zero tinham $12,7 \pm 1,17$ mg de clorofila a por g de massa seca (mg g^{-1} MS), $5,1 \pm 0,47$ mg g^{-1} MS de clorofila b e $3,0 \pm 0,32$ mg g^{-1} MS de carotenoides.



Figura 4. Aspecto geral de *Nidularium minutum* cultivada *in vitro* por 30 dias (Tempo Zero). Barra = 1,0 cm.

3.2. Avaliação do crescimento de plantas de *Nidularium minutum* mantidas em diferentes temperaturas

A porcentagem de sobrevivência variou entre os tratamentos térmicos. As plantas cultivadas a 5°C apresentaram sobrevivência de 14%, o que indica que esta temperatura não é ideal para uma coleção de crescimento lento desta espécie. Logo, não foi mantido o cultivo *in vitro* por seis meses nestas condições. Foi observada uma elevada porcentagem de sobrevivência para as plantas cultivadas por três meses nas temperaturas de 10, 15, 20 e 25°C (Controle), sendo, respectivamente, de 95%, 97%, 100% e 100%. Resultado similar também ocorreu para as plantas crescidas por seis meses, com porcentagem de 96% de sobrevivência para as plantas a 10°C enquanto nos outros tratamentos térmicos foi de 100%. A

sobrevivência a baixas temperaturas como 10 e 15°C indica a tolerância ao frio de *N. minutum*.

Na figura 5 é apresentado o aspecto geral de plantas de *N. minutum* crescidas por três e seis meses nas diferentes temperaturas. Foi possível observar uma redução no crescimento das plantas mantidas a baixas temperaturas, no entanto a morfologia das plantas foi similar ao tratamento controle. Observou-se alteração na coloração (aspecto verde claro) durante o cultivo *in vitro* por três e seis meses na temperatura de 10°C e apenas aos três meses na temperatura de 15°C (Figuras 5A, B, E e F).

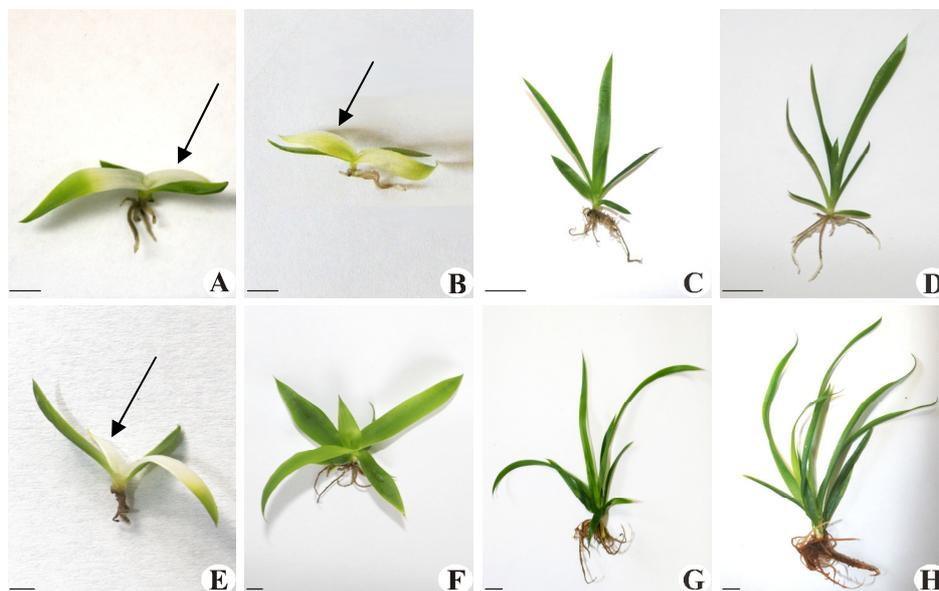


Figura 5. Aspecto geral de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por três (A-D) e seis meses (E-H) em diferentes temperaturas. (A, E) 10°C. (B, F) 15°C. (C, G) 20°C. (D, H) 25°C. Observar as variações da coloração das folhas entre os tratamentos (seta). Barras = 0,5 cm (A, B, E); 1,0 cm (C, D, F, G, H).

Em relação à biometria, observou-se que as temperaturas de 10 e 15°C induziram os menores valores para todos os parâmetros, o que evidencia a influência da temperatura na redução do crescimento. As plantas mantidas a 20°C apresentaram valores intermediários ou iguais aos das plantas controle (Figura 6). Aos seis meses, não foi avaliado o número de raízes da temperatura de 25°C, pois as plantas apresentaram o sistema radicular com intensa produção de raízes formando um aglomerado (Figura 7). A tentativa de quantificá-las poderia danificar muitas raízes, subestimando a contagem.

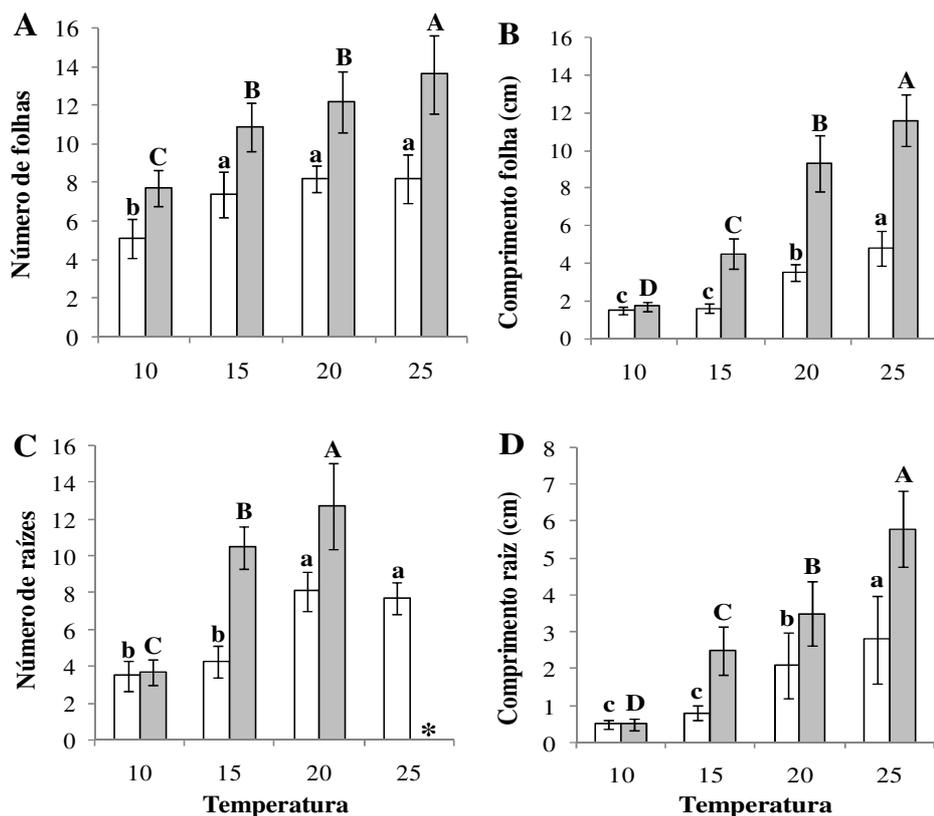


Figura 6. Número (A, C) e comprimento (B, D) de folhas e raízes de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* nas temperaturas de 10, 15, 20 e 25°C (Controle) por três (*coluna branca*) e seis meses (*coluna cinza*). As barras verticais indicam o desvio padrão. Letras minúsculas comparam valores de plantas crescidas por três meses e letras maiúsculas comparam valores de plantas crescidas por seis meses nas diferentes temperaturas pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%. ($n=20$). * dado não avaliado.



Figura 7. Plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por seis meses na temperatura de 25°C (Controle). Notar o adensamento de raízes. Barra = 1 cm.

As massas fresca e seca da parte aérea foram drasticamente menores nas plantas crescidas a 10°C (Tabela 1). Aos três meses, não houve diferença significativa entre a massa fresca e seca do sistema radicular nas temperaturas de 10 e 15°C (Tabela 1). Já aos seis meses, as plantas mantidas a 15°C mostraram valores próximos aos daquelas mantidas a 20°C (Tabela 1). Independentemente do período estudado, os maiores valores de massa foram observados para as plantas crescidas a 25°C (controle).

Na análise do teor de água, quase não houve diferenças entre os tratamentos (Tabela 1) para as plantas crescidas por três ou seis meses, apresentando um elevado valor para a parte aérea e raiz. Desse modo, a manutenção do teor hídrico pode ser um dos fatores que contribuíram para garantir a sobrevivência de *N. minutum* por mais tempo durante o cultivo *in vitro* em baixas temperaturas.

Tabela 1. Massa fresca, massa seca e teor hídrico da parte aérea e raiz de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* nas temperaturas de 10, 15, 20 e 25°C (Controle) por três e seis meses. Letras distintas na mesma coluna indicam que os dados diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%. Os valores representam a média composta de plantas ($n=3$).

Tratamento		Parte aérea			Raiz			Planta
Tempo (meses)	Temperatura (°C)	Massa fresca (mg planta ⁻¹)	Massa seca (mg planta ⁻¹)	Teor de água (%)	Massa fresca (mg planta ⁻¹)	Massa seca (mg planta ⁻¹)	Teor de água (%)	Teor de água (%)
3	10	15,3d	0,7d	95a	1,8c	0,2c	89a	95a
	15	31,3c	1,8c	94ab	2,8c	0,4c	87a	94ab
	20	88,6b	5,9b	93b	10,0b	1,5b	84a	92b
	25	109,3a	7,8a	93b	34,7a	3,2a	91a	92b
6	10	32,0c	1,6c	95a	0,9d	0,2c	72b	94a
	15	159,0b	14,9b	91b	36,7c	5,1b	86a	90a
	20	311,7b	20,8b	93ab	103,7b	7,7b	92a	92a
	25	1181,7a	56,1a	95a	503,0a	25,4a	95a	95a

Observando a distribuição da biomassa das plantas mantidas *in vitro* por três meses, pode-se notar que os valores relativos à parte aérea são maiores nas plantas cultivadas nas temperaturas de 10, 15 e 20°C quando comparadas aos de plantas do tratamento controle (Tabela 2).

Já após seis meses de cultivo *in vitro*, os valores correspondentes à parte aérea e raiz das plantas crescidas a 15, 20 e 25°C foram semelhantes. Plantas provenientes da temperatura de 10°C apresentam os maiores valores para a parte aérea e os menores para a raiz (Tabela 2), indicando maior investimento em biomassa da parte aérea em detrimento das raízes.

Tabela 2. Partição da biomassa (calculada com base na massa seca) da parte aérea e de raízes, em porcentagem, das plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* nas temperaturas de 10, 15, 20 e 25°C (Controle) por três e seis meses. Os valores representam a média composta de plantas ($n=3$).

Tratamento		Partição da biomassa (%)	
Tempo (meses)	Temperatura (°C)	Parte Aérea	Raiz
3	10	78	22
	15	83	17
	20	79	21
	25	71	29
6	10	87	13
	15	74	26
	20	73	27
	25	69	31

Com os resultados obtidos para *N. minutum* cultivada *in vitro* por três e seis meses, foi possível calcular a Taxa de Crescimento Relativo (TCR) para os parâmetros biométricos e a massa seca da parte aérea e radicular (Figura 8). De maneira geral, os maiores valores para a TCR foram verificados na primeira coleta, com decréscimo nas coletas seguintes, com

exceção das plantas de 15°C, em que se verificou menor valor no início do desenvolvimento e maior na última coleta, deduzindo que a baixa temperatura ocasionou um atraso no desenvolvimento dessas plantas (Figura 8).

O maior investimento no crescimento das plantas foi aos seis meses a 15°C, enquanto nas temperaturas de 20 e 25°C foi observado crescimento logo nos primeiros três meses de cultivo. O aumento no número de folhas ocorreu aos três meses para todas as temperaturas, havendo uma redução após seis meses sob os diferentes tratamentos térmicos, o que mostra que este parâmetro é menos influenciado pela temperatura. As plantas crescidas a 10°C apresentaram os menores valores quando mantidas por três meses nessas condições, sendo que com seis meses houve um decréscimo em todos os parâmetros, com exceção da massa seca da parte aérea (Figura 8), indicando que não houve investimento no crescimento das plantas nessa temperatura.

3.3. Teor de clorofila e de carotenoides

Aos três meses de cultivo *in vitro*, as plantas crescidas a 20 e 25°C apresentaram mais pigmentos fotossintetizantes do que aquelas mantidas nas outras temperaturas, sendo que não houve diferença significativa entre as plantas a 10 e 15°C (Figura 9).

Já aos seis meses, houve um aumento no conteúdo de clorofilas e carotenoides para as plantas crescidas a 15°C, enquanto para aquelas mantidas nos demais tratamentos térmicos houve redução destes valores, sendo esta redução mais acentuada para aquelas do controle (Figura 9). Deste modo, a quantidade de pigmentos foi maior nas plantas cultivadas a 20°C, seguida das plantas mantidas a 25 e 15°C, sendo que aquelas cultivadas a 10°C apresentaram os menores valores.

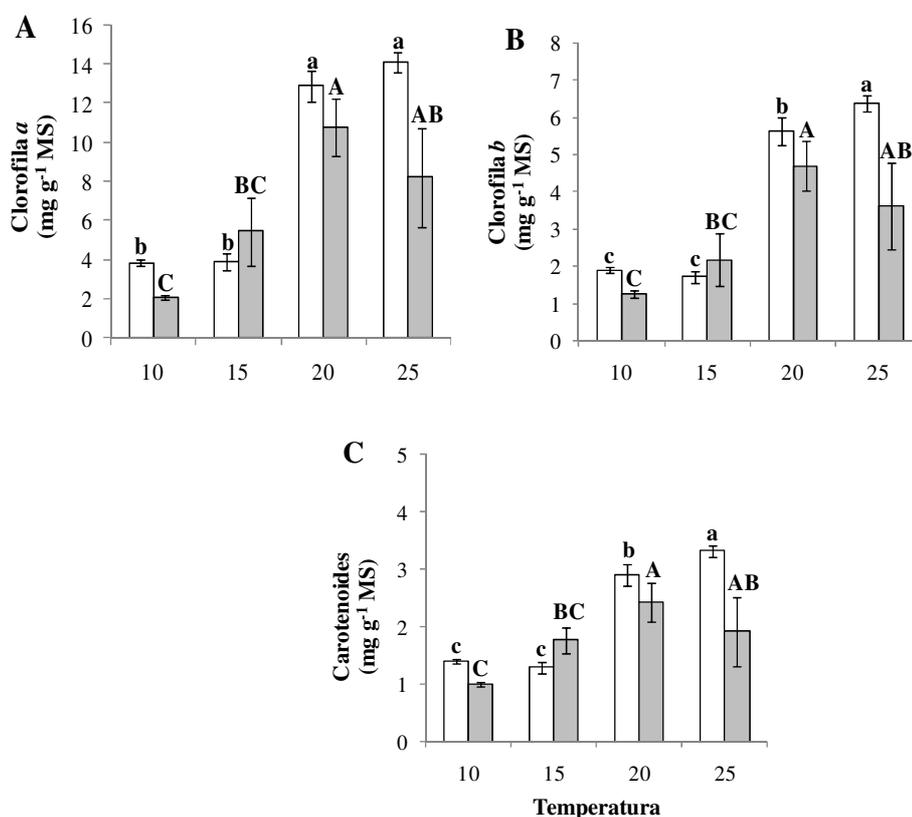


Figura 9. Conteúdo de clorofilas (A, B) e carotenoides (C) de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* nas temperaturas de 10, 15, 20 e 25°C (Controle) por três (*coluna branca*) e seis meses (*coluna cinza*). As barras verticais indicam o desvio padrão. Letras minúsculas comparam valores de plantas crescidas por três meses e letras maiúsculas comparam valores de plantas crescidas por seis meses nas diferentes temperaturas pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%.

Analisando a proporção carotenoides: clorofilas, é possível verificar uma maior quantidade de carotenoides em relação às clorofilas nas plantas mantidas nas temperaturas baixas (Tabela 3).

Tabela 3. Razão carotenoides: clorofilas de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por três e seis meses nas temperaturas de 10, 15, 20 e 25°C (Controle).

Tempo (meses)	Temperatura (°C)	Razão Carotenoides: Clorofilas
3	10	0,24
	15	0,23
	20	0,16
	25	0,16
6	10	0,30
	15	0,23
	20	0,16
	25	0,16

As plantas crescidas na temperatura de 10°C, tanto aos três quanto aos seis meses, apresentaram nas folhas mais novas uma coloração verde clara na base e no centro, contudo os ápices eram verdes mais escuros (Figuras 5A e E). Esta característica também ocorreu em cerca de 80% das plantas mantidas a 15°C por três meses (Figura 5B), o que pode estar relacionado às menores quantidades de pigmentos nessas temperaturas. Esse aspecto não foi observado nas plantas cultivadas a 20 e 25°C, cujas folhas eram totalmente verdes (Figuras 5C, D, G e H). Vale ressaltar que as plantas foram transferidas com um mês de cultivo (Tempo zero) para as baixas temperaturas, porém não foi relatada nenhuma diferença na coloração das plantas nessa idade (Figura 4), o que sugere que a baixa temperatura tenha influenciado esta característica. O aumento dos teores de clorofila apresentado pelas plantas crescidas por seis meses a 15°C pode ser explicado pela ausência de folhas com coloração verde clara nesse tratamento.

3.4. Análise anatômica

A estrutura foliar da planta adulta de *N. minutum*, em secção transversal na região mediana do limbo, mostra que a folha, completamente expandida, é dotada de escamas em ambas as faces (Figuras 10A e G), possui epiderme uniestratificada e lignificada (Figuras 10B-D), apresentando ocasionalmente células lignificadas no bordo foliar (Figura 10B).

O mesofilo é isobilateral apresentando camadas de parênquima aquífero com células de tamanhos variados nas duas superfícies da lâmina foliar, sendo esse tecido de reserva de água mais desenvolvido na superfície adaxial (Figuras 10A e D). A região clorofiliana é constituída pelo parênquima lacunoso, cujas lacunas de ar são delimitadas pelas células braciformes (Figuras 10A e F).

Os feixes vasculares são do tipo colateral e se distribuem de forma intercalada com as lacunas de ar (Figuras 10A e F). Os feixes apresentam uma bainha esclerenquimática e calotas de fibras nos polos, além da presença de uma bainha de células parenquimáticas, externa às calotas de fibras (Figura 10E).

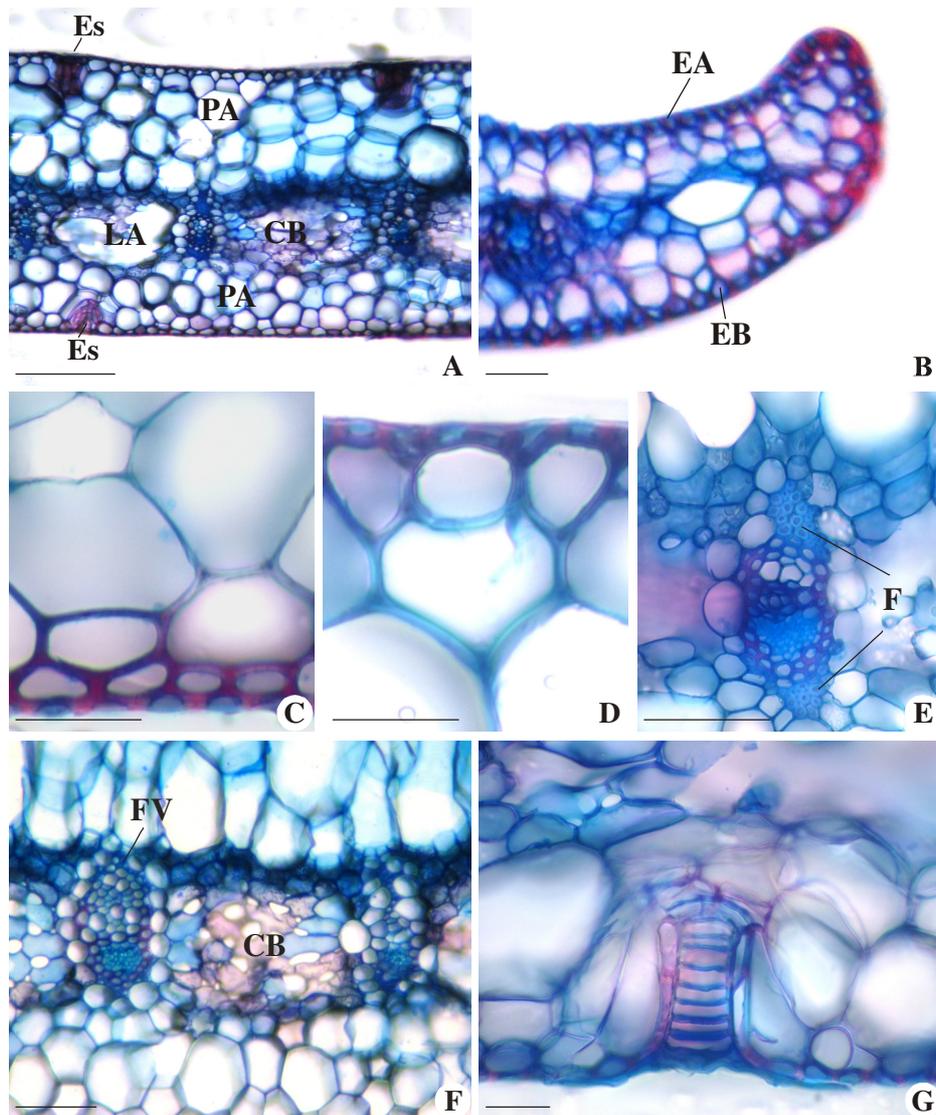


Figura 10. Secções transversais de folhas de plantas adultas de *Nidularium minutum*. (A) Aspecto geral da lâmina foliar com mesófilo isolateral com camadas de parênquima aquífero (PA) e lacunas de ar (LA) interrompidas por diafragmas de células braciformes (CB). (B) Detalhe do bordo foliar. (C) Superfície foliar da face abaxial. (D) Superfície foliar da face adaxial. (E) Detalhe do feixe vascular com calotas de fibras (F). (F) Detalhe da lacuna de ar com células braciformes (CB). (G) Detalhe da escama da face abaxial. Barra = 50 μm (A); 10 μm (B-E, G); 25 μm (F). CB = células braciformes; Es = escama; EA = epiderme da face adaxial; EB = epiderme da face abaxial; F = fibras; FV = feixe vascular; LA = lacunas de ar; PA = parênquima aquífero.

As plantas cultivadas *in vitro* nos diferentes tratamentos térmicos apresentam as mesmas estruturas e possuem os mesmos tecidos. As diferenças encontradas são observadas comparando o crescimento das plantas entre as temperaturas, independentemente do período estudado.

Secções transversais do terço médio da lâmina foliar de plantas cultivadas *in vitro* em diferentes temperaturas mostraram a epiderme recoberta por cutícula delgada em ambas as faces da folha (Figuras 11 e 12).

A epiderme é uniestratificada em ambas as faces, apresentando ocasionalmente células lignificadas no bordo foliar. Aos três meses de cultivo *in vitro*, a epiderme da face adaxial apresenta células arredondadas nas plantas mantidas a 10, 15 e 20°C quando comparadas com as plantas cultivadas a 25°C que possuem células tabulares, sendo que após seis meses de cultivo apenas aquelas crescidas a 10°C mostram células com formato arredondado (Figuras 11 e 12). Na análise biométrica, as plantas crescidas nas menores temperaturas (10 e 15°C) apresentaram os maiores valores para a espessura da epiderme da face adaxial, enquanto para a epiderme da face abaxial não foram encontradas diferenças entre os tratamentos após três meses de cultivo (Tabela 4). Os estômatos localizam-se na face abaxial (folha hipoestomática), no mesmo nível ou ligeiramente acima das demais células epidérmicas (Figuras 11E e 12E). As células-guarda apresentam cutícula periestomática que se projetam formando cristas.

O mesofilo é dorsiventral por toda a extensão da folha, com a presença de parênquima aquífero na face adaxial e clorofiliano na face abaxial (Figuras 11 e 12). Em relação a sua espessura, foi verificado que aos três meses nas plantas crescidas a 20°C a espessura da folha era menor, enquanto não foram observadas diferenças nas plantas mantidas nos outros tratamentos térmicos (Tabela 4). Aos seis meses, não houve diferenças nesse parâmetro (Tabela 4).

O parênquima aquífero possui células grandes com parede delgada e, às vezes, sinuosa, com presença de idioblastos contendo ráfides (Figuras 11 e 12). Subjacente a este tecido está o parênquima clorofiliano, constituído por células menores que as do parênquima aquífero, com presença de idioblastos com ráfides em todos os tratamentos (Figuras 11E e 12F).

Em relação à espessura do mesofilo, praticamente não houve diferenças entre os tratamentos após três e seis meses de cultivo *in vitro* (Tabela 4). Considerando os tecidos separadamente, a espessura do parênquima aquífero foi sempre maior para as plantas crescidas nas temperaturas de 10 e 15°C (Tabela 4). Aos três meses, não houve diferença entre os tratamentos quanto à espessura do parênquima clorofiliano, já aos seis meses as

plantas crescidas a 10°C apresentaram os menores valores (Tabela 4). Estes dados corroboram a análise da razão parênquima aquífero: clorofiliano, que mostra a presença de uma quantidade maior de parênquima aquífero nas temperaturas menores.

Os feixes vasculares são colaterais, possuem tamanho variado e estão distribuídos por todo o parênquima clorofiliano (Figuras 11 e 12). Os feixes vasculares de maior calibre apresentam bainha esclerenquimática, com calotas de fibras nos pólos nas plantas mantidas a 15 (apenas quando mantidas por seis meses), 20°C e no controle (Figuras 11 e 12). Já os feixes de menor calibre possuem bainha com início de lignificação, sendo as plantas cultivadas a 10°C as únicas que não apresentam calotas de fibras nos pólos (Figuras 11A e E; 12A e E).

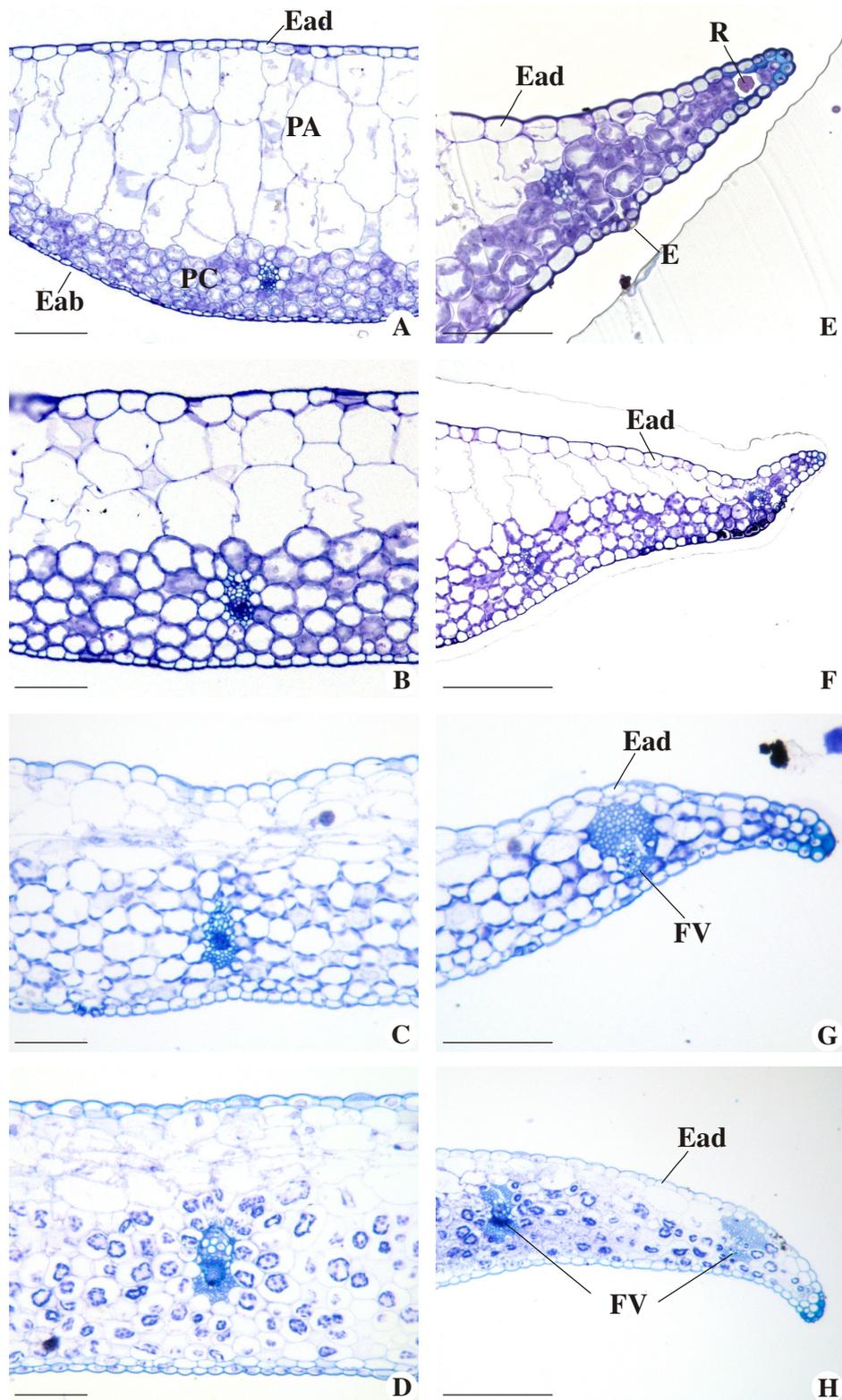


Figura 11. Cortes transversais do terço médio da folha de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por três meses nas temperaturas de 10°C (A, E), 15°C (B, F), 20°C (C, G) e 25°C (Controle) (D, H). A-D. Aspecto geral da folha. E-H. Detalhe do bordo foliar. Barra = 100 μ m (A, B, E); 70 μ m (C); 85 μ m (D); 200 μ m (F); 120 μ m (G, H). E = estômato; EA = epiderme da face adaxial; EB = epiderme da face abaxial; FV = feixe vascular; PA = parênquima aquífero; PC = parênquima clorofiliano; R = ráfides.

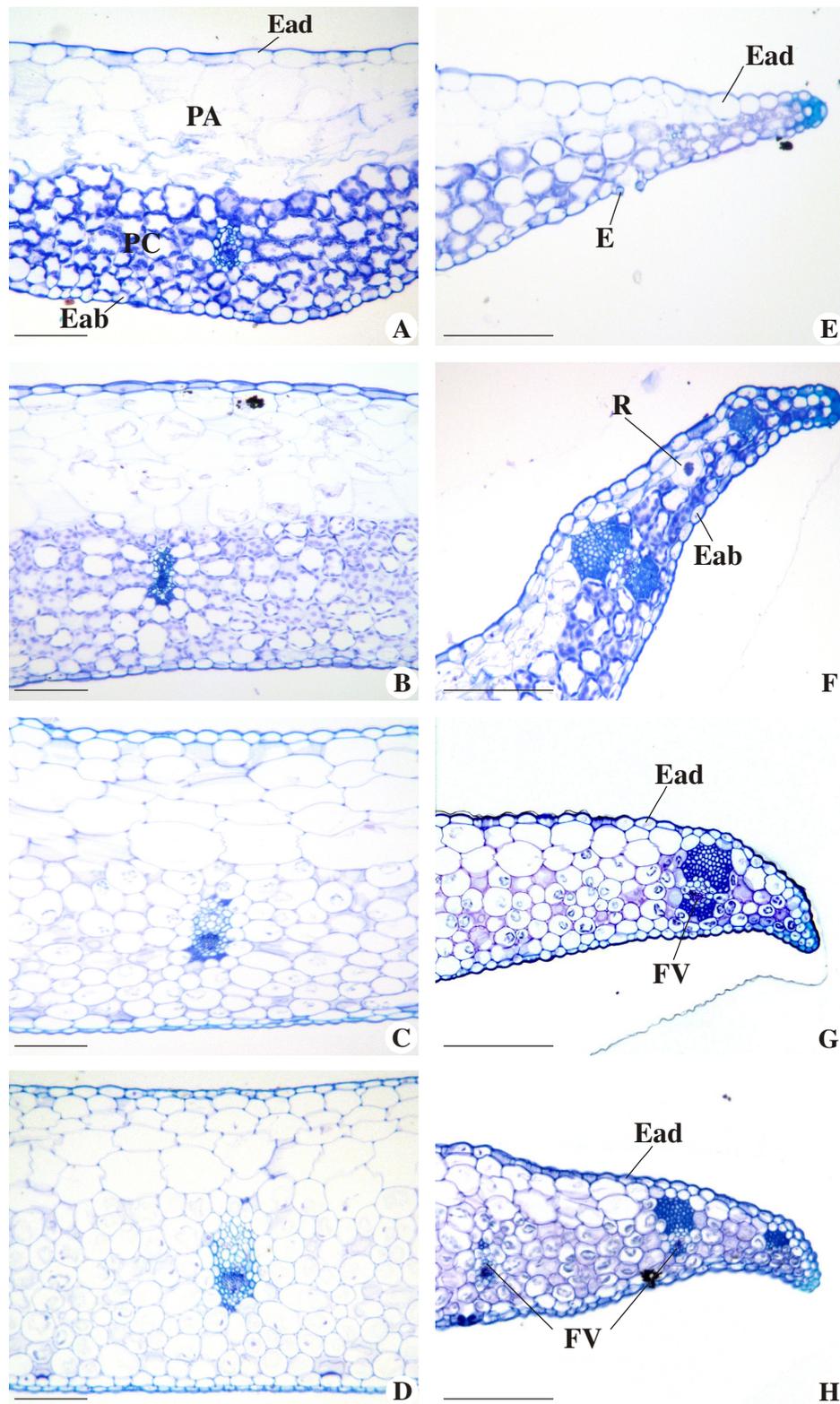


Figura 12. Cortes transversais do terço médio da folha de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por seis meses nas temperaturas de 10°C (A, E), 15°C (B, F), 20°C (C, G) e 25°C (Controle) (D, H). A-D. Aspecto geral da folha. E-H. Detalhe do bordo foliar. Barra = 130 μm (A); 180 μm (B); 100 μm (C, D); 200 μm (E, F, G, H). E = estômato; EA = epiderme da face adaxial; EB = epiderme da face abaxial; FV = feixe vascular; PA = parênquima aquífero; PC = parênquima clorofiliano; R = ráfides.

Tabela 4. Espessura dos tecidos de folhas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por três e seis meses nas temperaturas de 10, 15, 20 e 25°C (Controle). Letras distintas na mesma coluna indicam que os dados diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%.

Tempo (meses)	Temperatura (°C)	Epiderme da face adaxial (µm)	Epiderme da face abaxial (µm)	Parênquima aquífero (µm)	Parênquima clorofiliano (µm)	Espessura do mesofilo (µm)	Razão aquífero: clorofiliano
3	10	24,3a	11,5a	294,9a	130,1a	425,0a	2,3
	15	22,8a	13,5a	244,4ab	151,1a	395,5ab	1,6
	20	14,1b	9,8a	56,0c	151,1a	207,2b	0,4
	25	12,6b	8,1a	143,0bc	198,2a	341,3ab	0,7
6	10	24,5a	14,5a	255,7ab	141,8b	397,5a	1,8
	15	17,4b	9,9b	295,9a	253,4a	549,8a	1,2
	20	11,2c	6,0b	117,0b	233,6a	350,6a	0,5
	25	8,3c	6,0b	135,3b	228,8a	364,2a	0,6

3.5. Análise do conteúdo de carboidratos nas plantas de *Nidularium minutum* mantidas em diferentes temperaturas

3.5.1. Carboidratos solúveis e amido

Aos três meses, o conteúdo de carboidratos solúveis em folhas de *N. minutum* foi menor nas plantas mantidas a baixas temperaturas, sendo que aos seis meses ocorreu o inverso, com exceção para as plantas mantidas a 20°C em que houve um ligeiro aumento nos valores de açúcares (Figura 13A). Analisando o conteúdo de açúcares redutores, também foi possível observar um conteúdo maior nas plantas crescidas a 10 e 15°C, tanto aos três quanto aos seis meses (Figura 13B).

A análise da composição do extrato etanólico das folhas de *N. minutum* mostrou que a glucose é o açúcar predominante nas plantas crescidas a baixas temperaturas (Tabela 5), estando de acordo com os resultados obtidos com as análises colorimétricas, que revelaram elevado teor de açúcares solúveis. A sacarose não foi detectada nas plantas mantidas a 10°C por três meses e naquelas a 20°C, independentemente do período estudado (Tabela 5). Nas

plantas cultivadas a 15°C, a sacarose representa mais de 40% dos açúcares solúveis, sendo que houve um aumento na quantidade deste açúcar aos seis meses para as plantas crescidas a 25°C (Tabela 5).

A frutose foi encontrada em todos os tratamentos, porém sua proporção é de menos de 10% dos açúcares solúveis totais, com exceção para o tratamento a 20°C, que aos seis meses atingiu quase 20% (Tabela 5). A proporção sacarose: hexoses foi maior com o aumento da temperatura para as plantas crescidas por três ou seis meses (Tabela 5). Oligossacarídeos da família da rafinose não foram detectados nas condições experimentais utilizadas.

Para *N. minutum*, nas baixas temperaturas, cerca de 80% dos açúcares solúveis encontrados são redutores, enquanto para as plantas cultivadas na temperatura controle, eles representam apenas 16%. Depois de seis meses, os teores de açúcares totais e redutores foram significativamente menores nas plantas crescidas a 25°C (Figuras 13A e B).

O *myo*-inositol, um açúcar álcool, comumente relacionado com a tolerância ao frio, foi observado tanto nas temperaturas baixas quanto no controle (Tabela 5). A trealose foi detectada somente nas plantas mantidas a 10°C por três e seis meses, mas representa menos de 1% do conteúdo de açúcares solúveis.

O conteúdo de amido foi menor nas folhas de plantas crescidas a 10°C por três meses, em comparação com os demais tratamentos (Figura 13C). O maior conteúdo de amido foi encontrado nas plantas cultivadas a 15°C em ambos os períodos, e naquelas a 20°C por seis meses. Esta análise não foi realizada para as plantas cultivadas a 10°C durante seis meses por falta de material.

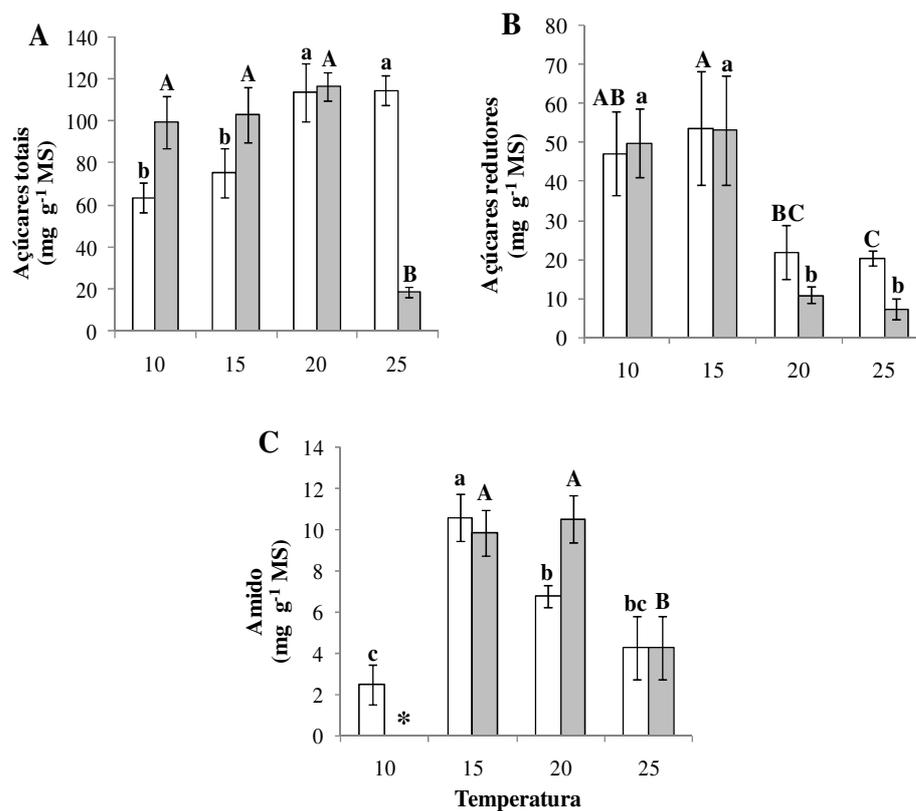


Figura 13. Conteúdo de carboidratos solúveis (A, B) e amido (C) em folhas de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por três (*coluna branca*) e seis meses (*coluna cinza*) nas temperaturas de 10°C, 15°C, 20°C e 25°C (Controle). (A) Açúcares totais. (B) Açúcares redutores. (C) Amido. As barras verticais indicam o desvio padrão. Letras minúsculas comparam os valores de plantas crescidas por três meses e letras maiúsculas comparam os valores de plantas crescidas por seis meses nas diferentes temperaturas pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%. * dado não avaliado.

Tabela 5. Porcentagem relativa de *myo*-inositol, frutose, glucose e sacarose nos extratos etanólicos em folhas de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por três e seis meses nas temperaturas de 10°C, 15°C, 20°C e 25°C (Controle). Letras distintas na mesma coluna indicam que os dados diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%.

Tratamento		% Relativa					
Tempo (meses)	Temperatura (°C)	<i>Myo</i> -inositol	Frutose	Glucose	Sacarose	Trealose	Razão Sacarose: Hexoses
3	10	17,1a	5,1c	77,7a	-	0,4a	-
	15	8,0d	4,3d	45,8c	41,9b	-	0,8
	20	15,6b	13,6a	70,7b	-	-	-
	25	9,7c	7,2b	40,1d	43,0a	-	0,9
6	10	11,9c	2,1d	52,5b	33,4c	0,1a	0,6
	15	14,1b	6,5b	33,4c	46,0b	-	1,1
	20	17,1a	18,8a	64,1a	-	-	-
	25	10,7c	5,1c	31,3c	52,8a	-	1,4

- não detectado.

3.5.2. Carboidratos estruturais

O rendimento em parede celular foi muito similar entre os tratamentos, variando de 13 a 20 mg g⁻¹ de massa seca (Figura 14A). Depois da hidrólise, o conteúdo de açúcares totais e ácidos urônicos foi maior nas plantas mantidas a 10°C, indicando que a parede celular nesse tratamento é mais lábil e contém mais polissacarídeos pécticos ácidos quando comparada com as de outras temperaturas (Figuras 14B e C).

A análise da composição de monossacarídeos por HPAEC/PAD das plantas controles mostrou, aos três meses, a presença de xilose/manose (67%), seguida de arabinose (20%), galactose (10%) e glucose (4%) como os principais monossacarídeos neutros encontrados nas paredes celulares de folhas de *N. minutum* (Figura 15), mantendo estas proporções aos seis meses. As plantas mantidas a 10°C apresentaram uma proporção maior de ramnose (1%), arabinose (25%) e galactose (14%), porém uma menor de glucose (7%) nas paredes celulares quando comparadas com folhas de plantas cultivadas a 15°C por três meses (Figuras 15A e B). Estes resultados em conjunto com o elevado conteúdo de ácidos urônicos encontrado são

compatíveis com a presença de uma elevada proporção de polissacarídeos pécnicos em plantas mantidas a baixas temperaturas.

Aos seis meses, a presença de ramnose (1%) foi relatada apenas nas plantas crescidas a 10°C (Figuras 15E-H). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos em relação à galactose, glucose e xilose/manose encontradas nesse período. Depois de seis meses de crescimento, monossacarídeos comumente encontrados em pectinas (ácidos urônicos, ramnose, arabinose e galactose) foram também elevados em plantas mantidas a 10°C, decaindo sua proporção naquelas crescidas nas demais temperaturas (Figuras 15E-H).

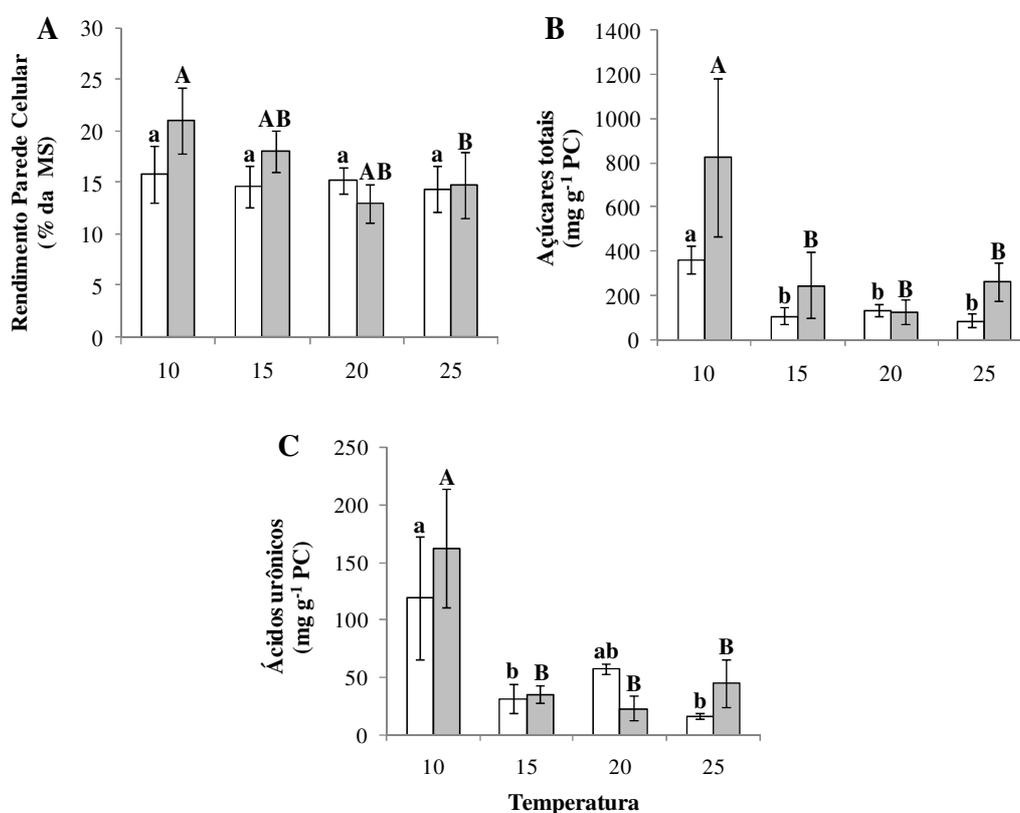


Figura 14. Rendimento da Parede Celular (onde MS = Massa Seca) (A), Açúcares Totais (B) e Ácidos Urônicos (C) em mg g^{-1} PC (onde PC = Parede Celular) de folhas de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por três (coluna branca) e seis meses (coluna cinza) nas temperaturas de 10°C, 15°C, 20°C e 25°C (Controle). As barras verticais indicam o desvio padrão. Letras minúsculas comparam os valores de plantas crescidas por três meses e letras maiúsculas comparam os valores de plantas crescidas por seis meses nas diferentes temperaturas pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%.

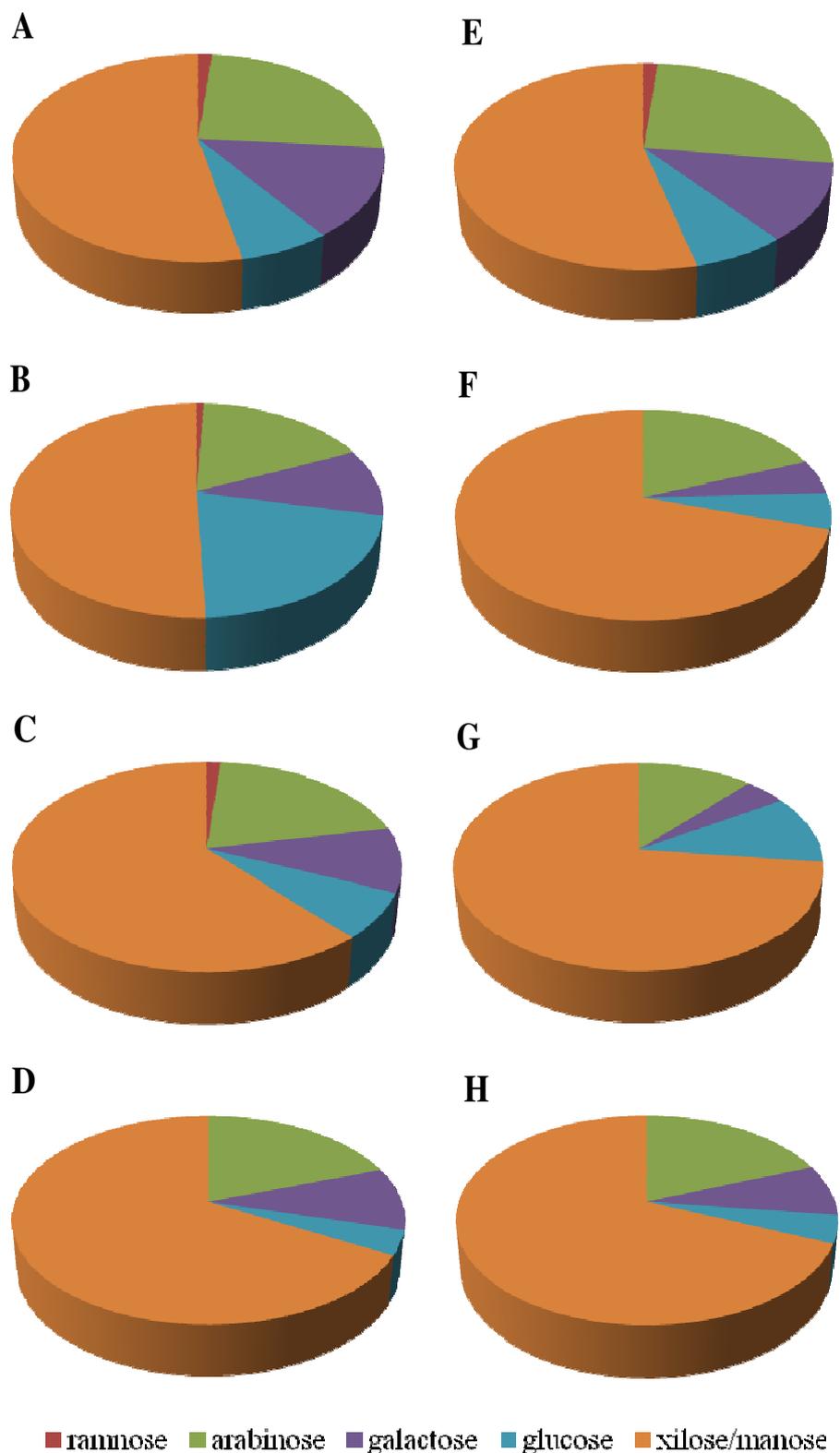


Figura 15. Composição em monossacarídeos neutros (% relativa) da parede celular bruta de folhas de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por três (A-D) e seis meses (E-H) nas temperaturas de 10°C (A, E), 15°C (B, F), 20°C (C, G) e 25°C (Controle) (D, H).

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam que *Nidularium minutum* é uma espécie tolerante ao frio, pois mostrou uma elevada taxa de sobrevivência (96%) quando mantida *in vitro* por seis meses na temperatura de 10°C, atingindo 100% quando cultivada a 15°C. O uso da temperatura de 15°C tem sido considerado adequado para a redução do crescimento de espécies tropicais sem causar danos às plantas (Pierik 1987), conforme demonstrado para bromélias como *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra que foi mantida *in vitro* por 24 meses (Pedroso *et al.* 2010) e *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivada por nove meses (Mollo *et al.* 2011), ambas nesta temperatura. Contudo, para *N. minutum*, espécie estudada neste trabalho, foi observada elevada taxa de sobrevivência à temperatura inferior a 15°C, resistindo por seis meses a 10°C constantes, indicando alta tolerância ao frio.

Os parâmetros biométricos e de massa analisados para *N. minutum* mostraram uma redução no crescimento das plantas quando mantidas em baixas temperaturas. Estes resultados estão de acordo com o encontrado para as bromélias *Alcantarea imperialis* (Mollo *et al.* 2011) e *Vriesea inflata* (Pedroso *et al.* 2010), que foram mantidas a 15°C e para *Ananas comosus* (L.) Merr. var. Smooth Cayenne crescida a 28°C (dia)/15°C (noite) (Nievola *et al.* 2005).

Em relação ao parâmetro número de folhas, este foi o que menos se alterou entre os tratamentos (Figura 6). Esta característica também foi relatada para outras espécies de bromélias crescidas no frio, como *Alcantarea imperialis* (Mollo *et al.* 2011), *Vriesea inflata* (Pedroso *et al.* 2010) e *Ananas comosus* (Nievola *et al.* 2005). Deste modo, este parâmetro parece variar pouco quando se comparam plantas mantidas em temperaturas baixas.

Foi verificada a influência da temperatura na divisão celular em folhas de milho (*Zea mays*, F₁, cv. DEA) (Ben-Haj-Salah & Tardieu 1995, Granier *et al.* 2000). Quando cultivadas a 30°C, as células das folhas se dividem cinco vezes mais rápido do que aquelas mantidas a 13°C, mesmo estas apresentando o mesmo tamanho (Ben-Haj-Salah & Tardieu 1995). Granier *et al.* (2000) relatam a influência da temperatura nas enzimas de regulação do ciclo celular, processo pelo qual ocorre a reprodução da célula e do seu DNA, sendo formado por quatro fases designadas G₁, S, G₂ e M. As enzimas-chaves que controlam a entrada das células no ciclo de divisão são as proteínas quinases dependentes de ciclinas ou CDKs, que são enzimas que fosforilam outras proteínas utilizando o ATP (Taiz & Zeiger 2006). A atividade dessa enzima é regulada pela temperatura, pois em folhas de milho foi maior nas temperaturas de 25,5°C e cerca da metade em folhas crescidas a 14°C. Também foi mencionada uma redução da taxa de divisão celular respectivamente de 70% e 40% em folhas

crescidas a 14°C e 19°C comparadas com aquelas a 25,5% (Granier *et al.* 2000). Deste modo, sugere-se que a baixa temperatura tenha prolongado o ciclo celular e reduzido à taxa de divisão celular em folhas de milho.

Em geral, as raízes mostram uma elevada sensibilidade às flutuações da temperatura. Tanto em temperaturas constantes e em condições de alternância, a taxa de crescimento da raiz aumenta com a temperatura (Nagel *et al.* 2009). Estes mesmos autores verificaram que em milho (*Zea mays* (L.) var. Alexander), as raízes primárias são 46% menores crescidas a 13°C quando comparadas com as de 25°C. Para *Brassica napus* (L.) cv. Campino, aos 10°C a formação de raízes laterais começou tardiamente e a taxa de ramificação foi reduzida a 60% quando comparada com o tratamento de 20°C (Nagel *et al.* 2009).

Para bromélias, foi observada uma redução no número de raízes em *Ananas comosus* quando cultivado em 28°C (dia)/15°C (noite) (Nievola *et al.* 2005) e em *Alcantarea imperialis* mantida a 15°C (Mollo *et al.* 2011). Em *N. minutum*, os valores da biometria da raiz sempre foram menores nas temperaturas de 10 e 15°C. A massa seca também foi menor em baixas temperaturas para *Alcantarea imperialis* (Mollo *et al.* 2011) e *Vriesea inflata* (Pedroso *et al.* 2010), mas *Ananas comosus* apresentou valores maiores quando comparados com as plantas crescidas a 28°C constantes.

A distribuição da biomassa também mostrou uma forte influência da temperatura no acúmulo de massa seca das raízes em *N. minutum*. Conforme a temperatura aumentou, houve uma maior porcentagem de raiz quando comparada com as temperaturas baixas (Tabela 2). Logo, nas temperaturas baixas o maior investimento ocorre na parte aérea e à medida que a temperatura vai aumentando, essa razão vai sendo alterada.

Nagel *et al.* (2009) conseguiram variar, durante o cultivo de *Brassica napus*, apenas a temperatura da raiz (10, 15 e 20°C), enquanto a temperatura da parte aérea se manteve constante (23°C (dia)/18°C (noite)). Com isso, os autores puderam afirmar que o impacto na redução da temperatura na raiz afeta mais o sistema radicular da planta do que a sua parte aérea, pois houve resultados similares para a massa seca da parte aérea daquelas crescidas nos diferentes tratamentos térmicos radiculares, porém foi observada uma redução de 42% no comprimento da raiz das plantas cultivadas a 10°C em relação àsquelas de 20°C.

A resposta das raízes a mudanças na temperatura é dinâmica, envolvendo a adaptação ao alongamento da zona de crescimento e mudanças na divisão celular (Nagel *et al.* 2009). Segundo ainda estes autores, como um padrão estável de crescimento da raiz requer um balanço entre o alongamento e a divisão celular do meristema, o declínio tardio no seu crescimento pode ser devido à produção insuficiente de novas células no meristema apical para compensar o aumento da taxa de alongamento celular.

Aos três meses, foram encontrados os menores valores para a TCR nas plantas mantidas a 10 e a 15°C (Figura 8). O efeito da temperatura na redução da TCR foi mostrado também para mamona (*Ricinus communis* cultivar BRS Energia), sendo que os autores ressaltam a elevada correlação positiva da temperatura com a taxa de crescimento relativo (Aires *et al.* 2011).

Foi observado aumento na TCR para as plantas crescidas nas diferentes temperaturas analisadas aos três meses, exceto para as plantas mantidas a 15°C (Figura 8). O aumento da TCR nas primeiras coletas também foi observado para mamoeiro (*Carica papaya* L.) (Lima *et al.* 2007), manjerição (*Ocimum brasiliicum* L.) (Barreiro *et al.* 2006) e couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) (Gondim *et al.* 2011). Esta taxa maior no início do desenvolvimento pode resultar em maior captura de luz pelas folhas, favorecendo que o índice da área foliar máximo seja atingido rapidamente (Gondim *et al.* 2011).

Para as plantas de 15°C, a TCR foi maior somente após seis meses de cultivo *in vitro*, indicando um atraso no crescimento quando comparada com as que cresceram em 20 e 25°C, que apresentaram uma TCR maior logo nos três primeiros meses (Figura 8). Essa diminuição na taxa de crescimento viabiliza a manutenção de *N. minutum* em coleções *in vitro* de crescimento lento, por meio da redução da temperatura de cultivo.

A baixa temperatura está relacionada com uma restrição na absorção de água e de nutrientes (Sharma *et al.* 2005), pois há uma diminuição das reações químicas resultando em menos energia metabólica disponível (Larcher 2006). A análise do teor hídrico de *N. minutum* foi semelhante em todos os tratamentos, independentemente do período estudado, tanto para a parte aérea como para a radicular (Tabela 1), mostrando que esta espécie se mantém hidratada mesmo em baixas temperaturas. Estes dados mostram uma importante adaptação ao frio, pois a água forma o ambiente onde ocorre a maioria das reações bioquímicas celulares e participa diretamente em muitas reações químicas essenciais (Taiz & Zeiger 2006). Além disso, o déficit hídrico leva a uma diminuição na atividade fotossintética pela redução do índice de troca de CO₂ e a sua condução para a folha, além de reduzir a concentração desse elemento nos espaços intracelulares (Faver *et al.* 1996).

Em geral o aumento de pigmentos tem sido associado a temperaturas de cultivo maiores como descrito por Boese & Huner (1990) que verificaram ser duas vezes maior o teor de pigmentos em folhas de espinafre (*Spinacia oleracea* L. cv. Savoy) mantidas a 16°C em relação àquelas sujeitas a 5°C e mostrado por Liu *et al.* (2010) para plantas de *Arabidopsis thaliana*, por Haldimann (1999) e Singh *et al.* (2012) para plantas de milho (*Zea mays* L.). Contudo, para a bromélia tropical *Vriesea inflata*, foi demonstrado não haver diferenças entre as plantas mantidas a 15 e 28°C, indicando que esta espécie conseguiu assimilar nitrogênio

em pigmentos mesmo a baixa temperatura (Pedroso *et al.* 2010), revelando a existência de mecanismos de adaptação importantes mesmo no ambiente tropical, possivelmente presentes também em *N. minutum*.

De modo interessante, apesar das folhas de *N. minutum* apresentarem uma coloração verde clara nas temperaturas de 10 e 15°C aos três meses e apenas nas de 10°C aos seis meses, o desenvolvimento do cloroplasto não foi totalmente reprimido, pois foi possível quantificar a clorofila e carotenoides nesse período. A 2°C, folhas de cevada (*Hordeum vulgare* cv. Abyssinian) apresentam muitos cloroplastos com danos nos tilacoides, porém alguns não apresentam essa característica, o que contribui para a quantidade pequena de clorofila encontrada nessas folhas (Smillie *et al.* 1978). Falk *et al.* (1996) relatam que embora para algumas espécies o desenvolvimento do cloroplasto não seja prejudicado a baixas temperaturas, a organização do fotossistema I e II é significativamente alterada. Todavia para plantas de *N. minutum* mantidas a 15°C a atividade fotossintética pode ter sido eficiente dado o incremento de biomassa das plantas aos seis meses de cultivo nessa temperatura.

A explicação para o que ocorreu na parte basal das folhas que eram mais claras do que o verde da porção apical nas plantas de *N. minutum* crescidas a 10°C, pode ser semelhante ao observado por Liu *et al.* (2010) para plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a 8°C. Esses autores sugerem que houve um atraso na biogênese do cloroplasto nessa temperatura e também uma alteração no perfil do RNA_t no cloroplasto, que culminaram em problemas na tradução e acúmulo de proteínas nesta organela. Outra hipótese para esse aspecto pode estar relacionado ao observado em folhas de *Eucalyptus globulus* que também apresentaram uma coloração mais clara quando expostas a baixas temperaturas e a luz solar (Close *et al.* 1999). Segundo os autores desse trabalho, as taxas de fotossíntese podem ser reduzidas no frio, tornando a folha incapaz de utilizar toda a energia luminosa absorvida e, em algumas ocasiões, sua capacidade de absorver a energia excede a sua capacidade de dissipá-la. A produção de espécies reativas de oxigênio nessas condições causa um dano visível no tecido chamado em inglês de “photobleaching” (branqueamento).

A radiação fotossinteticamente ativa na câmara de germinação tipo BOD, utilizada nesse estudo, é em torno de $45\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, considerada baixa se comparada com os valores encontrados no interior da floresta, como por exemplo na Floresta Ombrófila Densa no Estado do Paraná em que há uma variação de 60 a $1666\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, de acordo com a fitofisionomia estudada (Boeger *et al.* 2009). *N. minutum* é uma bromélia terrestre e adaptada à sombra, pois no local de ocorrência dessa espécie, a Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, permanece o domínio de Matas Altas em aproximadamente 67% da Reserva, apresentando nas áreas mais conservadas uma cobertura mais densa, com dossel de 15 metros ou mais de

altura e contínuo, com poucas interrupções e irregularidades, sendo o interior da mata bem úmido e sombreado (Sugiyama *et al.* 2009). Desse modo, esta espécie pode ser capaz de alterar os pigmentos no caso de aumentar a intensidade luminosa no frio.

Smillie *et al.* (1978) verificaram o efeito da temperatura na estrutura do cloroplasto na cevada (*Hordeum vulgare* cv. Abyssinian). Os autores também observaram um clareamento nas folhas da cevada quando crescida a 2°C e associaram esse fenômeno a uma inibição no desenvolvimento do cloroplasto, apesar das plantas continuarem a crescer, embora lentamente. Na análise da ultraestrutura do cloroplasto, nas folhas claras dificilmente são reconhecidos os tilacoides e há uma escassez de ribossomos. Já nas folhas verdes, os grana apresentam menos tilacoides e estes possuem frisos na membrana, sendo que estas características não foram observadas em folhas crescidas a 32°C. Os autores concluem que a exposição à baixa temperatura resultou em estruturas anormais no cloroplasto. Em folhas de pepino (*Cucumis sativus* L.) cultivado a 4°C também foram encontradas alterações no cloroplasto e na mitocôndria, sendo que os danos no cloroplasto foram similares aos reportados para as folhas verdes de cevada e na mitocôndria foi relatado que elas pareciam vazias por dentro (Xu *et al.* 2012).

Estudos mostram que as plantas respondem ao estresse pela baixa temperatura reduzindo seu conteúdo de clorofila e aumentando a razão carotenoides: clorofilas (Haldimann 1999), como foi relatado para *N. minutum* cultivada a 10 e 15°C. Os carotenoides são pigmentos acessórios na fotossíntese, mas também são conhecidos como agentes fotoprotetores contra a fotooxidação em plantas (Sun & Wen 2011).

Relacionando os valores da TCR com o conteúdo de clorofilas e carotenoides, foi verificado um elevado valor da TCR e conteúdo de clorofilas e carotenoides para as plantas a 20 e 25°C aos três meses, e para as plantas a 15°C por seis meses (Figuras 8 e 9). Levando em consideração que as variações na TCR também são influenciadas pela disponibilidade de nitrogênio, os elevados valores da TCR sugerem uma elevada eficiência no uso do nitrogênio no processo de fixação de carbono (Poorter *et al.* 1990).

Considerando a anatomia foliar da planta adulta, de modo geral as características encontradas para *N. minutum* estão de acordo com as descritas para outras bromélias (Tomlinson 1969, Sajo *et al.* 1998). Comparando com a organização estrutural de *Nidularium innocentii* Lem., que também está presente na mesma Reserva, e com outros representantes desse gênero, foi observado uma semelhança na organização dos tecidos aquífero e clorofiliano (Sajo *et al.* 1998). Em relação ao tecido armazenador de água, é mais comumente evidente na face adaxial (Tomlinson 1969), enquanto para *N. minutum* foi descrito em ambas

as faces na folha adulta e somente na face adaxial para as plantas cultivadas *in vitro*, estando o parênquima clorofiliano estritamente localizado no centro da estrutura laminar.

Apesar de ser relatada na literatura a influência do frio no aumento da espessura das folhas (Boese & Huner 1990, Stefanowska *et al.* 1999, Gursuch *et al.* 2010), não houve diferenças para *N. minutum* cultivada nas baixas temperaturas quando comparada com as plantas cultivadas a 20 ou 25°C, independentemente do período (Tabela 4). Resultado parecido foi visto para *Vriesea inflata*, onde também não foram observadas mudanças no número de camadas do parênquima (Pedroso *et al.* 2010), porém no abacaxi houve aumento nas camadas do parênquima clorofiliano, o que levou a um aumento na espessura total das folhas (Nievola *et al.* 2005).

Para *N. minutum*, as diferenças encontradas foram em relação a espessura dos parênquimas aquífero e clorofiliano analisados separadamente, o que indica uma mudança no padrão de desenvolvimento para este espécie quando exposta a baixa temperatura. Após três meses, as plantas a 20 e 25°C investiram no parênquima clorofiliano, enquanto naquelas cultivadas a 10 e 15°C o desenvolvimento foi dirigido para a formação de tecidos acumuladores de água (parênquima aquífero), provavelmente como um mecanismo de tolerância ao frio (Tabela 4). Aos seis meses, este padrão se mantém nas plantas a 10°C, porém ele não permanece naquelas crescidas a 15°C, pois há um aumento na espessura do parênquima clorofiliano, fazendo com que este se iguale ao das plantas cultivadas a 20 e 25°C, sugerindo que estas plantas estejam aclimatizadas ao frio após seis meses de cultivo *in vitro*.

Além do parênquima aquífero, existem outras adaptações para possibilitar o acúmulo de água durante o frio. Em *N. minutum* foram observadas a presença de estômatos somente na superfície abaxial da folha e a ocorrência da cutícula peristomática nas células-guarda (Figuras 11 e 12), que são características que facilitam a conservação de água nos tecidos. No abacaxizeiro cultivado *in vitro* na temperatura de 28°C (dia)/15°C (noite) foi verificado a presença de um sistema vascular mais conspícuo (Nievola *et al.* 2005), enquanto em *Rheum emodi* Wall. foi encontrado um aumento no número de feixes vasculares nas plantas mantidas a 15°C quando comparadas com aquelas crescidas a 25°C (Malik *et al.* 2009). Segundo estes autores, tais modificações estariam envolvidas no aumento do transporte de água e nutrientes, que podem ser reduzido durante o cultivo em baixas temperaturas.

O aumento na espessura do parênquima clorofiliano nas plantas crescidas a 15°C por seis meses pode estar relacionado ao aumento no conteúdo de pigmentos fotossintéticos, além da ausência do branqueamento nesse período em relação às plantas de três meses (Figuras 5 e 9). Considerando que o conteúdo de clorofilas está relacionado com o status nitrogenado das

plantas, já que o nitrogênio é um componente essencial da clorofila (Wiedenfeld *et al.* 2009), o maior conteúdo desse pigmento pode também indicar a adaptação ao frio das plantas crescidas a 15°C ao atingirem seis meses de cultivo.

A baixa temperatura reduz termodinamicamente a cinética das reações metabólicas, induzindo a rigidez das membranas e levando a um distúrbio em vários processos, como abertura dos canais iônicos, reações de transferência de elétrons etc. (Ruelland *et al.* 2009). A sobrevivência de plantas a temperaturas acima de 10°C está relacionada a mudanças no seu metabolismo, como o acúmulo de substâncias osmoprotetoras (açúcares, aminoácidos, solutos compatíveis), pela ativação da transdução de sinais que levam à estabilização de membranas, e alterações na expressão gênica, provendo proteção em diversos níveis (Sharma *et al.* 2005).

A sacarose é um açúcar cujo acúmulo é comumente atribuído à tolerância a baixas temperaturas (Guy *et al.* 2008, Janská *et al.* 2010, Singh *et al.* 2012). Entretanto, em *N. minutum* a razão sacarose: hexoses livres foi baixa nas plantas mantidas a 10°C (Tabela 5), sugerindo que este açúcar foi degradado nessas condições. Aos seis meses, as plantas crescidas a 15°C apresentaram esta razão parecida com o controle, o que mostra o envolvimento desse açúcar na adaptação a baixa temperatura.

Maior acúmulo de outros açúcares, que não a sacarose, foi observado em folhas de repolho (*Brassica oleracea* cv. Banchurisou). Após 10 dias mantidas a 5°C, foi observado aumento no conteúdo de glucose e frutose nas plantas em relação àquelas crescidas a 20°C (dia)/15°C (noite) (Sasaki *et al.* 1996). Em *Alcantarea imperialis*, Mollo *et al.* (2011) também relataram maior acúmulo de carboidratos de baixo peso molecular como a rafinose e a estaquiase e atribuíram esse aumento a uma proteção osmótica associada a uma tolerância ao frio.

Em *N. minutum* crescida a 15 e 20°C foi observado maior conteúdo de amido, aos seis meses, quando comparada com plantas mantidas na temperatura de 10°C (Figura 13C), como também ocorreu para plantas de milho quando cultivadas a 25°C (dia)/18°C (noite) (Singh *et al.* 2012). O amido é o carboidrato de estoque dominante nas plantas. Em plantas de milho, o amido se acumula durante a exposição ao frio e diminui com o aumento da temperatura (Singh *et al.* 2012). A análise do conteúdo de amido para a bromélia *Aechmea* “Maya” mantida em casa de vegetação durante a primavera, verão, outono e inverno, foi similar entre as quatro estações, sugerindo que o acúmulo e a degradação deste açúcar foram pouco afetados pelas diferentes estações (Ceuster *et al.* 2010). Já para *Alcantarea imperialis* mantida *in vitro* foi observado um menor conteúdo de amido após nove meses a 15°C (Mollo *et al.* 2011).

A fotossíntese é afetada, assim como todos os processos de desenvolvimento e metabolismo, quando as plantas são expostas a temperaturas baixas (Knight & Knight 2012). Como a maior parte do carbono fixado na fotossíntese é utilizada para a formação de carboidratos, principalmente sacarose e amido, que são os produtos mais estáveis do processo fotossintético (Majerowicz 2008), a concentração desses compostos também pode ser muito alterada, o que pode ter ocorrido com as plantas de *N. minutum* cultivadas em diferentes tratamentos térmicos.

Foi verificada a presença de trealose apenas nas plantas cultivadas a 10°C por três ou seis meses. A trealose é um açúcar encontrado em vários tipos de organismos, como fungos, bactérias e insetos, sendo que é conhecida como um agente protetor contra a perda de água durante a desidratação ou congelamento (Fernandez *et al.* 2012). Em *Vitis vinifera* L. foi relatado seu acúmulo durante o cultivo a 4°C e para bromélias, a presença desse açúcar foi relatada pela primeira vez para *A. imperialis* cultivada *in vitro* a 15°C (Mollo *et al.* 2011). Ambos os autores confirmam o papel da trealose na resistência ao estresse causado pelo frio.

O rendimento da parede celular foi o mesmo em todos os tratamentos, independentemente do período, indicando que a proporção da parede celular acompanhou o aumento da massa seca na mesma proporção durante o crescimento nas diferentes temperaturas. Já na parede celular de *Brassica napus* var. *oleifera*, houve um aumento de duas vezes no rendimento a 2°C quando comparada com aquelas mantidas a 20°C (dia)/15°C (noite) e isso foi atribuído ao aumento no conteúdo de pectinas, em especial aos ácidos urônicos, na parede celular (Kubacka-Zebalska & Kacperska 1999). Em *N. minutum* também houve um aumento na proporção de açúcares totais e ácidos urônicos na parede celular das plantas crescidas a 10°C, porém isso não influenciou seu rendimento.

O aumento das pectinas na parede celular de plantas tem sido associado à tolerância a baixas temperaturas (Weiser *et al.* 1990, Kubacka-Zebalska & Kacperska 1999, Solecka *et al.* 2008). Em *Brassica napus* var. *oleifera* mantida a 2°C houve um aumento no conteúdo de glucose, galactose e arabinose quando mantida no frio (Kubacka-Zebalska & Kacperska 1999), e o mesmo foi mostrado para a ervilha crescida na mesma temperatura, com relação à xilose (Weiser *et al.* 1990). Para *N. minutum* a 10°C, foi observado além desses açúcares, uma maior quantidade de ramnose do que nos outros tratamentos, o que indica maior proporção de ramnogalacturonanos nessas paredes celulares. Xilose/manose foram os monossacarídeos mais abundantes na parede de *N. minutum*, independentemente da temperatura estudada, indicando a presença de xilanos e/ou mananos nessas paredes, como comumente encontrado em monocotiledôneas (Carpita & McCann 2000).

Weiser *et al.* (1990) atribuem o acréscimo no conteúdo de pectinas a uma maior extensão da parede celular, o que eles sugerem que originaria um aumento na sua rigidez e isso levaria a um aumento na resistência ao colapso induzido pela desidratação causada pelas baixas temperaturas. Maior rigidez também foi relacionada com o aumento na atividade da enzima pectina metil-esterase (PME), que foi verificada em maior quantidade na parede celular de folhas de *B. napus* var. *oleifera* mantidas a 2°C, que refletiu no aumento da rigidez da folha (Solecka *et al.* 2008). Isso induziu a uma maior resistência das células da folha à desidratação causada pelo frio/congelamento, levando a uma inibição da expansão da lâmina foliar. Estes autores sugerem que mudanças nas propriedades mecânicas da parede celular contribuem para a tolerância ao frio. A atividade da PME promove remoção de grupos metila das pectinas, levando a maior associação dos polissacarídeos pécticos com íons cálcio e consequente aumento na rigidez da parede celular.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que a temperatura de 15°C é propícia para possibilitar a redução do crescimento de *N. minutum* de modo a diminuir a necessidade de subcultivos, criando subsídios para o estabelecimento futuro de uma coleção *in vitro* sob crescimento lento por meio da utilização de temperaturas baixas como descrito para *Huernia hystrix* (Amoo *et al.* 2009), *Cochlospermum regium* (Scrank) Pilg. (Camillo *et al.* 2009), *Podophyllum peltatum* L. (Lata *et al.* 2010), *Vriesea inflata* (Pedroso *et al.* 2010), *Alcantarea imperialis* (Mollo *et al.* 2011), entre outras.

Este trabalho mostrou que adaptações ao frio ocorrem na espécie tropical *N. minutum* como menor conteúdo de pigmentos fotossintéticos, aumento na razão carotenoides: clorofilas, maior conteúdo de carboidratos solúveis, estruturais e amido, e maior espessura do parênquima aquífero.

A redução do crescimento de *N. minutum* ocorreu nas temperaturas de 10 e 15°C, sendo que ambas podem ser usadas para a formação de uma coleção *in vitro* de crescimento lento de *N. minutum*.

Contudo, a avaliação da aclimatização das plantas mantidas nestas temperaturas deve ser realizada de modo a verificar se as alterações induzidas pelo cultivo a baixa temperatura irá influenciar na restauração do crescimento, visando à produção de mudas da coleção a serem utilizadas em programas de repovoamento como realizado para outras espécies endêmicas e/ou ameaçadas (Bisht *et al.* 2012, Prathanturarug *et al.* 2012, Sarmast *et al.* 2012) como *N. minutum*, ou mesmo disponibilizadas ao mercado de ornamentais de modo a reduzir a procura de exemplares retirados do ambiente natural. Esse procedimento pode contribuir, indiretamente, para diminuir o extrativismo ilegal no ambiente natural, que juntamente com

outras ações antrópicas na Mata Atlântica, afetam a sobrevivência de muitas outras espécies de bromélias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires, R.F., Silva, S.D.A. & Eicholz, E.D.** 2011. Análise do crescimento de mamona semeada em diferentes épocas. *Ciência Rural* 41 (8): 1347-1353.
- Amaral, L.I.V., Gaspar, M., Costa, P.M.F., Aidar, M.P.M. & Buckeridge, M.S.** 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34 (4): 425-431.
- Amoo, S.O., Finnie, J.F. & Staden, J.V.** 2009. Effects of temperature, photoperiod and culture vessel size on adventitious shoot production of *in vitro* propagated *Huernia hystrix*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 233-238.
- Barreiro, A.P., Zucareli, V., Ono, E.O. & Rodrigues, J.D.** 2006. Análise de crescimento de plantas de manjeriço tratadas com reguladores vegetais. *Bragantia* 65 (4): 563-567.
- Ben-Haj-Salah, H. & Tardieu, F.** 1995. Temperature affects expansion rate of maize leaves without change in spatial distribution of cell length. *Plant Physiology* 109: 861-870.
- Benincasa, M.M.P.** 2003. Análise de crescimento de plantas (noções básicas). Funep, Jaboticabal.
- Benson, E.E.** 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27: 141-219.
- Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bisht, S., Bisht N.S. & Bhandari, S.** 2012. *In vitro* micropropagation in *Polygonatum verticillatum* (L.) All. an important threatened medicinal herb of Northern India. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18 (1): 89-93.
- Boeger, M.R.T., Bui, C. & Goldenberg, R.** 2009. Arquitetura foliar comparativa de *Miconia sellowiana* (DC.) Naudin (Melastomataceae) em diferentes fitofisionomias no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23 (3): 657-665.
- Boese, S.R. & Huner, N.P.A.** 1990. Effect of growth temperature and temperature shifts on spinach leaf morphology and photosynthesis. *Plant Physiology* 94: 1830-1836.
- Browse, J. & Xin, Z.** 2001. Temperature sensing and cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 241-246.

- Camillo, J., Scherwinski-Pereira, J.E., Vieira, R.F. & Peixoto, J.R.** 2009. Conservação *in vitro* de *Cochlosperm regium* (Schrank) Pilg.-Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 11 (2): 184-189.
- Carneiro, L.A. & Mansur, E.** 2004. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. *Vidalia* 2 (1): 12-20.
- Carpita, N. & McCann, M.** 2000. The cell wall. *In*: B.B. Buchanan, W. Gruissem & R.L. Jones. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist, Rockville. pp. 53-107.
- Carter, G.A. & Knapp, A.K.** 2001. Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. *American Journal of Botany* 88 (4): 677-684.
- Ceuster, J., Borland, A.M., Ceusters, N., Verdoot, V., Godts, C. & Proft M.P.** 2010. Seasonal influences on carbohydrate metabolism in the CAM bromeliad *Aechmea* ‘Maya’: consequences for carbohydrate partitioning and growth. *Annals of Botany* 105: 301-309.
- Close, D.C., Beadle, C.L., Holz, G.K. & Ravenwood, I.C.** 1999. A photobleaching event at the North forest products somerset nursery reduces growth of *Eucalyptus globulus* seedlings. *Tasforest* 11: 59-67.
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-355.
- Falk, S., Maxwell, D.P., Laudénbach, D.E. & Huner, N.P.A.** 1996. Photosynthetic adjustment to temperature. *In*: N.R. Baker (ed.). *Photosynthesis and the environment*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 367-385.
- Faver, K.L., Gerik, T.J. & El-Zik, K.M.** 1996. Late season water stress in cotton: II. Leaf gas exchange and assimilation capacity. *Crop Science* 36: 922-928.
- Fernandez, O., Vandesteene, L., Feil, R., Baillieul, F., Lunn, J.E. & Clément, C.** 2012. Trehalose metabolism is activated upon chilling in grapevine and might participate in *Burkholderia phytofirmans* induced chilling tolerance. *Planta* doi 10.1007/s00425-012-1611-4.
- Filisetti-Cozzi, T.M.C.C. & Carpita, N.C.** 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197: 157-162.
- Gondim, A.R.O., Prado, R.M., Correia, M.A.R., Alves, A.U., Cecílio Filho, A.B. & Politi, L.S.** 2011. Curva de crescimento e acúmulo de matéria seca em couve-flor cultivada em substrato. *Bioscience Journal* 27 (1): 88-94.

- Granier, C., Inzé, D. & Tardieu, F.** 2000. Spatial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34^{cdc2} kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water conditions. *Plant Physiology* 1393-1402.
- Gursuch, P.A., Pandey, S. & Atkin, O.K.** 2010. Temporal heterogeneity of cold acclimation phenotypes in *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell and Environment* 33: 244-258.
- Gutjahr, M.R. & Tavares, R.** 2009. Clima. *In: M.I.M.S. Lopes, M. Kirizawa & M.M.R.F. Melo (orgs.). Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. Instituto de Botânica, São Paulo. pp. 39-51.*
- Guy, C.L., Huber, J.L.A. & Huber, S.C.** 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiology* 100: 502-508.
- Guy, C.L., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J. & Hinch, D.K.** 2008. Metabolomics of temperature stress. *Physiology Plantarum* 132: 220-235.
- Haldimann, P.** 1999. How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in sensitivity to low temperature? *Journal of Experimental Botany* 50 (333): 543-550.
- Janská, A., Marsík, P., Zelenková, S. & Ovesná, J.** 2010. Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment. *Plant Biology* 12: 395-405.
- Karnovsky, M.J.** 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.
- Knight, M.R. & Knight, H.** 2012. Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist* 195: 737-751.
- Kubacka-Zebalska, M. & Kacperska, A.** 1999. Low temperature-induced modifications of cell wall content and polysaccharide composition in leaves of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.). *Plant Science* 148: 59-67.
- Larcher, W.** 2006. *Ecofisiologia vegetal*. Rima, São Carlos.
- Lata, H., Moraes, R.M., Bertoni, B. & Pereira, A.M.S.** 2010. *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. *In vitro Cellular & Development Biology – Plant* 46: 22-27.
- Lichtenthaler, H.K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *In: L. Packer & R. Douce (eds). Methods in enzymology. Academic Press, London. pp. 350-382.*
- Lima, J.F., Peixoto, C.P. & Ledo, C.A.S.** 2007. Índices fisiológicos e crescimento inicial de mamoeiro (*Carica papaya* L.) em casa de vegetação. *Ciência e Agrotecnologia* 31 (5): 1358-1363.

- Liu, X., Yu, F. & Rodermel, S.** 2010. An Arabidopsis pentatricopeptide repeat protein, SUPPRESSOR OF VARIEGATION7, is required for FtsH-Mediated chloroplast biogenesis. *Plant Physiology* 154: 1588-1601.
- Majerowicz, N.** 2008. Fotossíntese. *In: G.B. Kerbauy. Fisiologia vegetal.* 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. pp. 82-133.
- Malik, S., Kumar, R., Vats, S.K., Brushan, S., Sharma, M. & Ahuja, P.S.** 2009. Regeneration in *Rheum emodi* Wall.: A step towards conservation of an endangered medicinal plant species. *Engineering in Life Sciences* 9 (2): 130-134.
- Mamede, M.C.H., Souza, V.C., Prado, J., Barros, F., Wanderley, M.G.L. & Rando, J.G.** 2007. Livro vermelho das espécies vegetais ameaçadas de extinção no Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo.
- McIlvaine, T.C.** 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry* 49 (1): 183-186.
- Mercier, H. & Nievola, C.C.** 2003. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1 (1): 57-62.
- Mollo, L., Martins, M.C.M., Oliveira, V.F., Nievola, C.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2011. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107 (1): 141-149.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nagel, K.A., Kastenholz, B., Jahnke, S., van Dusschoten, D., Aach, T., Mühlich, M., Truhn, D., Scharr, H., Terjung, S., Walter, A. & Schurr, U.** 2009. Temperature responses of roots: impact on growth, root system architecture and implications for phenotyping. *Functional Plant Biology* 36: 947-959.
- Nievola, C.C., Kraus, J.E., Freschi, L., Souza, B.M. & Mercier, H.** 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets growth *in vitro*. *In vitro Cellular & Development Biology – Plant* 41: 832-837.
- Pedroso, A.N.V., Lazarini, R.A.M., Tamaki, V. & Nievola, C.C.** 2010. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. *Revista Brasileira de Botânica* 33 (3): 407-414.
- Pereira, A.R., Pereira, T.S., Rodrigues, A.S. & Andrade, A.C.S.** 2008. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. *Acta Botanica Brasilica* 22 (4): 1150-1162.

- Pierik, R.L.M.** 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Pooter, H., Remkes, C. & Lambers, H.** 1990. Carbon and nitrogen economy of 24 wild species differing in relative growth rate. *Plant Physiology* 94: 621-627.
- Prathanturarug, S., Rungthipwan, P., Jenjittikul, T., Chuakul, W. & Saralamp, P.** 2012. *In vitro* propagation of *Stemona hutanguriana* W.Chuakul, an endangered medicinal plant. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18 (3): 281-286.
- Rao, N.K.** 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3 (2): 136-145.
- Ruelland, E., Vaultier, M., Zachowski, A. & Hurry, V.** 2009. Cold signaling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research* 49: 35- 150.
- Sajo, M.G., Machado, S.R. & Carmello-Guerreiro, S.M.** 1998. Aspectos estruturais de folhas de bromélias e suas implicações no agrupamento de espécies. *In: E.M.C. Leme (ed.). Canistropsis: bromélias da Mata Atlântica.* Salamandra, Rio de Janeiro. pp. 101-111.
- Sakai, W.S.** 1973. Simple method for different staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology* 48: 247-249.
- Sarasan, V., Cripps R., Ramsay, M.M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G. & Rowntree, J.K.** 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in past decade. *In vitro Cellular & Development Biology – Plant* 42: 206-214.
- Sarmast, M.K., Salehi, H. & Khosh-Khui, M.** 2012. Micropropagation of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca* Carrière from orthotropic stem explants. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18 (3): 265-271.
- Sasaki, H., Ichimura, K. & Oda, M.** 1996. Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of cabbage seedlings. *Annals of Botany* 78: 365-369.
- Sharma, P., Sharma, N. & Deswal, R.** 2005. The molecular biology of the low-temperature response in plants. *BioEssays* 47: 1048-1059.
- Smillie, R.M., Critchley, C., Bain, J.M. & Nott, R.** 1978. Effect of growth temperature on chloroplast structure and activity in barley. *Plant Physiology* 62: 191-196.
- Singh, I., Kumar, U., Singh, S.K., Gupta, C., Singh, M. & Kushwaha, S.R.** 2012. Physiological and biochemical effect of 24-epibrassinolide on cold tolerance in maize seedlings. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18 (3): 229-236.
- Solecka, D., Zebrowski, J. & Kacperska, A.** 2008. Are pectins involved in cold acclimation and de-acclimation of winter oil-seed rape plants? *Annals of Botany* 101: 521-530.

- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-68.
- Stefanowska, M., Kuras, M., Kubacka-Zebalska, M. & Kacperska, A.** 1999. Low temperature affects patterns of leaf growth and structure of cell walls in winter oilseed rape (*Brassica napus* L., var. *oleifera* L.). *Annals of Botany* 84: 313-319.
- Sugiyama, M., Santos, R.P., Aguiar, L.S.J., Kirizawa, M. & Catharino, E.L.M.** 2009. Caracterização e mapeamento da vegetação. *In: M.I.M.S. Lopes, M. Kirizawa & M.M.R.F. Melo (orgs.). Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. Instituto de Botânica, São Paulo. pp. 105-117.*
- Sun, X. & Wen, T.** 2011. Physiological roles of plastid terminal oxidase in plant stress response. *Journal of Biosciences* 36 (5): 951-956.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2006. *Fisiologia vegetal*. 3 ed. Artmed, Porto Alegre.
- Tomlinson, P.B.** 1969. Commelinales-Zingiberales. Vol. III. *In: C.R. Metcalfe (ed.). Anatomy of the monocotyledons. Clarendon Press, Oxford.*
- Verhoeven, A.S.; Adams III, W.W. & Demmig-Adams, B.** 1999. The xanthophyll cycle and acclimation of *Pinus ponderosa* and *Malva neglecta* to winter stress. *Oecologia* 18: 277-287.
- Vieira, M.L.C.** 2000. Conservação de germoplasma *in vitro*. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* 14: 18-20.
- Xu, F., Zhang, D., Zhu, F., Tang, H., Lv, X., Cheng, J., Xie, H. & Lin, H.** 2012. A novel role for cyanide in the control of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings response to environmental stress. *Plant, Cell and Environment*. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02531.x.
- Weiser, R.L., Wallner, S.J. & Waddell, J.W.** 1990. Cell wall and extension mRNA changes during cold acclimation of pea seedlings. *Plant Physiology* 93: 1021-1026.
- Wiedenfeld, B., Wallace, B.W. & Hons, F.** 2009. Indicators of cotton nitrogen status. *Journal of Plant Nutrition* 32: 1353-1370.
- Yuanyuan, M., Yali, Z., Jiang, L. & Hongbo, S.** 2009. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *African Journal of Biotechnology* 8 (10): 2004-2010.

Capítulo 2

Efeito da temperatura de cultivo *in vitro* na aclimatização da bromélia endêmica *Nidularium minutum* Mez.

RESUMO

A aclimatização de plantas pertencentes a uma coleção *in vitro* de crescimento lento em baixas temperaturas deve ser avaliada quando se deseja a produção de mudas para repovoamento, sobretudo no caso de espécies endêmicas ameaçadas de extinção, como a bromélia *Nidularium minutum* Mez. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de plantas dessa bromélia, provenientes do cultivo *in vitro* em diferentes temperaturas. Plantas de *N. minutum*, obtidas da germinação *in vitro* em meio de Murashige & Skoog (1962) com a metade da concentração dos macronutrientes (MS/2), foram mantidas nas temperaturas de 10°C, 15°C, 20°C e 25°C (controle). Após três (T3) e seis meses (T6) nessas condições, as plantas foram transferidas para bandejas de isopor com casca de *Pinus* como substrato, sendo mantidas a 25°C por 120 dias. A cada 30 dias foram avaliados parâmetros biométricos, sendo que após 120 dias foi realizada a análise de pigmentos fotossintéticos. Os resultados mostraram uma menor sobrevivência das plantas aclimatizadas do cultivo *in vitro* a 10°C, tanto de T3 como de T6. Não foram verificadas alterações morfológicas nas plantas aclimatizadas, sendo que as folhas com coloração mais clara, observada nas plantas *in vitro* crescidas a 10°C e a 15°C (apenas em T3), foram retornando a coloração normal após a aclimatização e não foram encontradas novas folhas com esse aspecto. Observou-se um crescimento ao longo dos 120 dias de aclimatização, e de modo geral, os menores valores foram encontrados para as plantas aclimatizadas provenientes de 10°C que tinham menor conteúdo de clorofila em comparação às demais. Devido à maior sobrevivência e valores de taxa de crescimento expressivos, sugere-se o uso da temperatura de 15°C para a formação de uma coleção *in vitro* de crescimento lento, sendo viável a retomada do crescimento das plantas aclimatizadas após o cultivo *in vitro* sob esta temperatura, visando à produção de mudas.

Palavras-chave: Transferência *ex vitro*, resfriamento, repovoamento, micropropagação, sobrevivência.

Effect of temperature of the *in vitro* culture on the acclimatization of endemic bromeliad *Nidularium minutum* Mez.

ABSTRACT

The acclimatization of plants belonging to an *in vitro* collection under slow growth at low temperatures should be evaluated when it is desired to produce seedlings for reforestation, especially in the case of endangered endemic species such as the bromeliad *Nidularium minutum* Mez. The aim of this study was to evaluate the growth of this bromeliad plants, from *in vitro* culture at different temperatures. Plants of *N. minutum*, obtained from *in vitro* germination in Murashige & Skoog (1962) with half the concentration of macronutrients (MS/2), were maintained at temperatures of 10°C, 15°C, 20°C and 25°C (control). After three (T3) and six months (T6) under these conditions, the plants were transferred to trays with pine bark as substrate, being kept at 25°C for 120 days. Every 30 days the biometric parameters were evaluated, and after 120 days the analysis of photosynthetic pigments was performed. The results showed a lower survival of acclimatized plants from the *in vitro* culture at 10°C, both from T3 and T6. No morphological changes were observed in plants acclimatized, and the leaves with lighter color, as observed in the plants grown *in vitro* at 10°C and 15°C (T3 only), began returning to normal color after acclimatization, and new leaves with this aspect were not found. There was an increase on the growth over the 120 days of acclimatization, and in general, the lowest values were found for plants acclimatized from 10°C that presented less chlorophyll content compared to the others. Due to higher survival and expressive growth rate values, this work suggested the use of 15°C to form an *in vitro* collection under slow growth, with a viable growth resumption from acclimatized plants after *in vitro* culture under that temperature, aimed at the production of seedlings.

Keywords: *ex vitro* transfer, cold, repopulation, micropropagation, survival.

1. INTRODUÇÃO

Muitos aspectos da biotecnologia têm levado a um aumento do interesse na pesquisa do cultivo *in vitro* de plantas, estando esta aérea em expansão na produção comercial, pois permite rápida multiplicação de matrizes selecionadas (Hung *et al.* 2011), atendendo a demanda do mercado interno e externo de plantas ornamentais. Outra vantagem dessa técnica é a produção de plantas livre de doenças, já que plantas propagadas convencionalmente uma vez infectadas por microrganismos endógenos os transmitem às gerações seguintes, resultando em uma diminuição no rendimento das culturas (Mercier & Kerbauy 1997).

A produção de plantas ornamentais por meio do cultivo *in vitro* envolve a passagem destas para o crescimento em estufa (*ex vitro*), e esta etapa é chamada de aclimatização. Uma elevada taxa de sobrevivência das plantas aclimatizadas é crucial para o sucesso da multiplicação utilizando o cultivo *in vitro* (Hung *et al.* 2011). Alguns autores a considera crítica e representa, em alguns casos, um limite ao processo de micropropagação (Hartmann *et al.* 2002). Isto ocorre pelo fato das plantas *in vitro* crescerem em um ambiente com baixa intensidade luminosa, condições assépticas, em um meio nutritivo e uma atmosfera com alto nível de umidade (Hazarika 2006), características não mais existentes quando transferidas para as condições *ex vitro*.

Segundo Hartmann *et al.* (2002), o período em que as plantas permanecem em aclimatização varia conforme a espécie, condições da cultura, composição do meio de cultivo, uso de reguladores, entre outros. Porém, a presença e o grau de desenvolvimento das raízes são fatores limitantes para o processo de aclimatização, já que as plantas irão depender da capacidade de absorção dos nutrientes presentes no substrato para sobreviver a essa nova condição. Por isso, as avaliações das raízes antes e após o período de aclimatização são importantes para o acompanhamento do seu crescimento (Aoyama *et al.* 2012).

Um dos fatores que influenciam na sobrevivência das plantas aclimatizadas é a condição de cultivo *in vitro* previamente utilizada. Uma maior concentração de sacarose durante o cultivo *in vitro* do abacateiro (*Persea americana* Mill.) resultou em 100% de sobrevivência das plantas após dois meses de aclimatização, enquanto aquelas obtidas da concentração menor apresentaram 70% de sobrevivência (la Viña *et al.* 1999). Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) mantidas *in vitro* em baixa ou alta irradiância mostraram 100% de sobrevivência quando aclimatizadas, sendo que as diferenças fisiológicas (como, por exemplo, o conteúdo de carboidratos, amido e pigmentos fotossintéticos) relatadas entre os tratamentos *in vitro* foram gradualmente desaparecendo durante o crescimento *ex vitro* (Kadleček *et al.* 2001).

Estudos vêm mostrando que a transferência das plantas cultivadas *in vitro* para o crescimento em estufa pode ser favorável pelo uso de baixas temperaturas, como relatado em Campostrini & Otoni (1996). Plantas de *Podophyllum peltatum* L. que foram mantidas *in vitro* sob 10°C e depois aclimatizadas na temperatura de 25°C mostraram maior taxa de sobrevivência e plantas mais vigorosas, quando comparadas com aquelas aclimatizadas e provenientes do cultivo *in vitro* a 25°C (Lata *et al.* 2010). Para bromélias cultivadas *in vitro* sob temperaturas baixas, foi investigada a aclimatização de *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra mantida por dois anos a 15°C, transferida para 28°C por um ano e posteriormente aclimatizada, sendo observada uma taxa de 100% de sobrevivência após três meses de cultivo (Pedroso *et al.* 2010). Não foram encontrados outros relatos sobre a aclimatização de bromélias cultivadas *in vitro* em temperaturas baixas constantes.

No capítulo 1 desta dissertação foi identificada a resistência a temperaturas baixas constantes quando plantas de *N. minutum*, uma espécie de bromélia endêmica de Paranapiacaba, considerada ameaçada de extinção, eram cultivadas *in vitro*. Foi observado que a 15°C e 10°C as plantas eram menores que aquelas mantidas a 25°C, diminuindo a necessidade de subcultivos nessa condição térmica de temperatura baixa. Contudo, deve ser averiguada a possibilidade de aclimatização dessas plantas, caso seja necessário restabelecer o crescimento visando à produção de mudas, seja para reintrodução ou mesmo para atender ao mercado de plantas ornamentais. Portanto, este capítulo teve por objetivo identificar a possibilidade de aclimatização de plantas de *N. minutum* provenientes do cultivo *in vitro* em baixas temperaturas (15°C e 10°C).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estabelecimento do cultivo *in vitro* de *Nidularium minutum* em diferentes temperaturas

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

Foram utilizadas sementes de *Nidularium minutum* Mez. coletadas na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba – SP (Figura 1A), conforme descrito no Capítulo 1 (item 2.1). As sementes foram submetidas à desinfestação superficial em frasco contendo álcool etílico a 70% por cinco minutos, sendo, em seguida, imersas em solução do fungicida Benomyl 0,1% por 15 minutos e, posteriormente, colocadas em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2%, acrescida de duas gotas de Tween 20[®], durante uma hora, em agitação.

Foram depositadas 100 sementes por placa de Petri contendo 20 mL do meio de cultura Murashige & Skoog (1962-MS) na concentração de 50% da composição original dos macronutrientes, mantendo-se a concentração de micronutrientes, acrescidos de 3% de sacarose, 0,01% de *myo*-inositol e 0,01% de tiamina HCl. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de 5 g L⁻¹ de ágar e a sua esterilização foi realizada em autoclave, a 121°C, durante 15 minutos. As sementes foram mantidas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas, irradiância de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 \pm 2°C por 30 dias.

Após este período, as plantas foram transferidas para frascos com 250 mL de capacidade e foram adicionados 40 mL deste mesmo meio de cultura (Figura 1B). Foram colocadas cinco plantas por frasco e estes distribuídos em cinco câmaras de germinação nas temperaturas de 10 \pm 2 °C, 15 \pm 2 °C, 20 \pm 2 °C e 25 \pm 2 °C (sendo esta última temperatura considerada o controle) com fotoperíodo de 12 horas e irradiância média de 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram utilizados 150 frascos por tratamento térmico.

Foram selecionados os períodos de permanência *in vitro*, ou seja, após três e seis meses denominados de T3 e T6, respectivamente, após os quais as plantas foram transferidas para a condição *ex vitro*, conforme descrito a seguir. Após três meses de cultivo, as plantas do lote T6 foram colocadas em frascos com novo meio nutritivo para que permanecessem por mais três meses *in vitro*, antes de serem transferidas para a fase de aclimatização.

2.2. Estabelecimento da aclimatização (cultivo *ex vitro*)

Aos três (T3) e seis meses (T6) foram retiradas dos frascos 80 plantas de cada tratamento térmico (10, 15, 20 e 25 °C), com exceção das plantas cultivadas *in vitro* a 10°C

por seis meses que foram separadas 100 plantas. Todas foram lavadas em água corrente para remover o meio de cultura, a fim de evitar a proliferação de microrganismos. Em seguida, foram transferidas para bandejas de isopor com capacidade para 200 plantas. Utilizou-se como substrato casca de *Pinus* (previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 45 minutos) (Figura 1C). Uma vez por semana as plantas foram irrigadas com solução nutritiva contendo a concentração original de micronutrientes do meio de Murashige & Skoog (1962) e a de macronutrientes reduzida à metade (Santos *et al.* 2010). Para evitar a perda excessiva de umidade, as bandejas foram envolvidas por saco plástico transparente, conforme Pedroso *et al.* (2010) (Figura 1D).

As plantas foram mantidas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas, irradiância de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 120 dias, sendo que a cada 30 dias foram feitas avaliações de crescimento conforme descrito a seguir.

A figura 2 mostra um fluxograma indicando as etapas da aclimatização das plantas provenientes do cultivo *in vitro* nas diferentes temperaturas.



Figura 1. *Nidularium minutum* Mez. (A) Aspecto da planta em floração. (B) Frasco de cultivo *in vitro* com plantas jovens (3 meses). (C e D) Etapas da aclimatização: Plantas após cultivo *in vitro* são colocadas em bandejas de isopor (C) envolvidas por saco plástico (D) e mantidas na temperatura de 25°C. Barras = 1,0 cm (B); 5,0 cm (C, D).

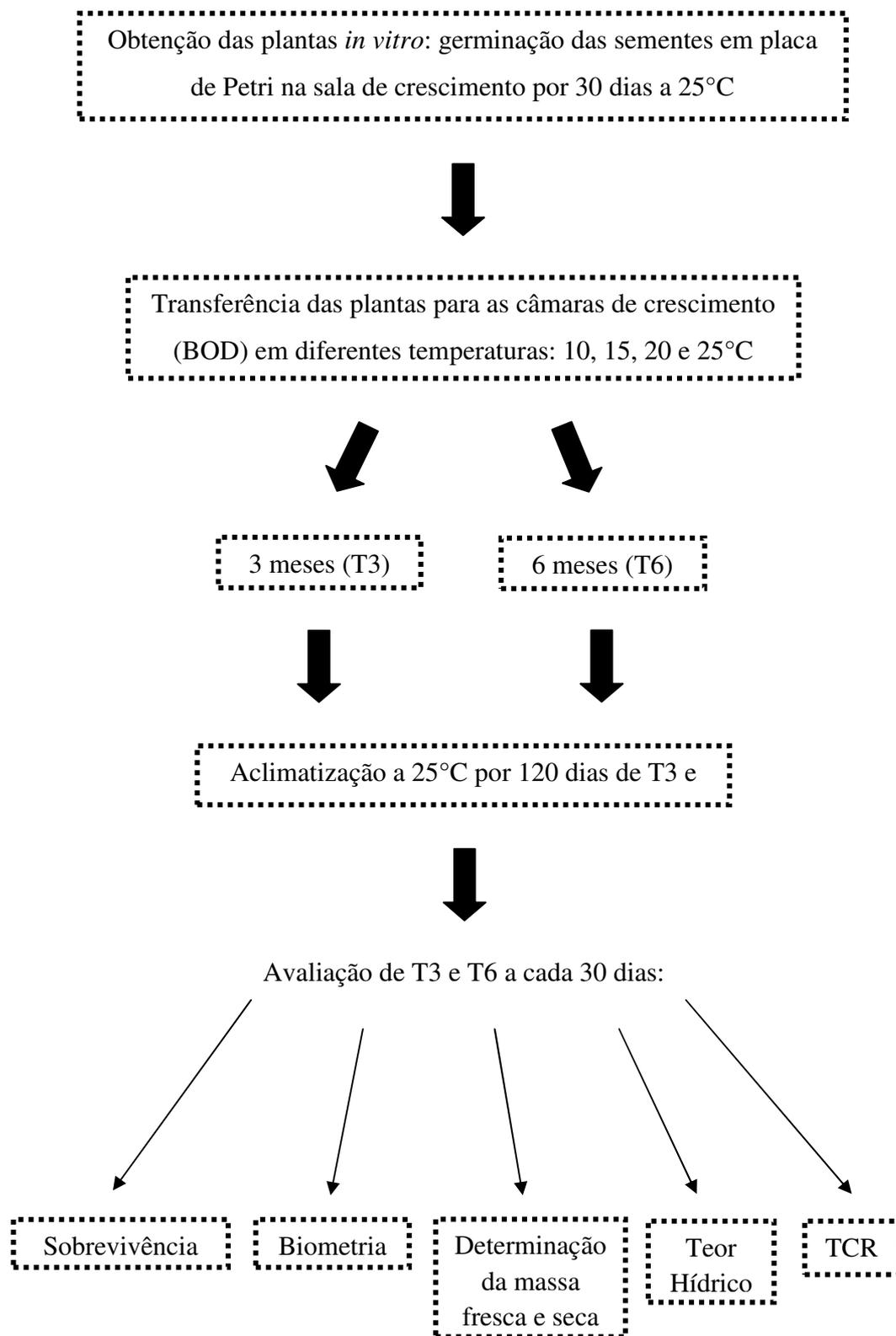


Figura 2. Fluxograma das etapas de aclimatização a 25°C de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por três (T3) e seis meses (T6) em diferentes temperaturas (10, 15, 20 e 25°C - Controle).

2.3. Parâmetros avaliados

2.3.1. Sobrevivência

A cada 30 dias foram analisados o número de plantas aclimatizadas vivas e mortas de T3 e T6 provenientes dos diferentes tratamentos térmicos do cultivo *in vitro*.

2.3.2. Análise biométrica

Nesta análise foram avaliadas 20 plantas, coletadas a cada 30 dias, quanto ao número de raízes e folhas e, também, quanto ao comprimento da raiz e da folha mais longa.

2.3.3. Determinação de massa

A cada trinta dias, retiraram-se, ao acaso, 20 plantas aclimatizadas provenientes das diferentes temperaturas estudadas para a determinação da massa fresca e seca. As plantas foram separadas em duas partes, a aérea e as raízes, utilizando-se três amostras compostas para cada coleta. As medidas de massa seca foram realizadas após secagem em estufa a 60°C até que as amostras não apresentassem variação na quantidade de massa.

A partir dos dados de massa seca, foi determinada a partição da biomassa da parte aérea e raízes, segundo a equação:

$$\text{Partição da biomassa} = \frac{\text{massa seca do órgão} \times 100}{\text{massa seca total da planta}}$$

2.3.4. Teor hídrico

A partir dos dados de massa fresca e seca foi possível calcular a quantidade de água (em porcentagem) nas plantas aclimatizadas. A equação utilizada foi:

$$\text{Teor de água} = \frac{\text{massa fresca} - \text{massa seca}}{\text{massa fresca}} \times 100$$

2.4. Taxa Relativa de Crescimento (TCR)

A Taxa de Crescimento Relativo (TCR) é a variação ou incremento em massa, altura, número de folhas, ou qualquer outro parâmetro de avaliação de crescimento, ao longo de um determinado período, estando diretamente relacionado ao valor alcançado no período anterior (Benincasa 2003). Para esta análise foram utilizados os dados de número, comprimento e massa seca de folhas e raízes das plantas cultivadas *in vitro*.

A equação utilizada foi:

$$TCR = [(LnP_2 - LnP_1)] (t_2 - t_1)^{-1}$$

Onde:

Ln é o logaritmo natural, P_2 é o valor atual do parâmetro, P_1 é o valor anterior do parâmetro e t é o tempo (índice $_1$ = valor inicial e índice $_2$ = valor final).

2.5. Determinação do teor de clorofila e de carotenoides

Amostras compostas de folhas de plantas aclimatizadas por 120 dias provenientes de T3 e T6 foram congeladas em freezer para a quantificação de clorofilas e de carotenoides, segundo técnica descrita por Lichtenthaler (1987), utilizando-se três amostras para cada coleta.

De acordo com esse método, o material vegetal congelado a -20°C foi macerado em acetona pura gelada e filtrado em papel, sendo o filtrado coletado em balão volumétrico de 25 mL. A acetona pura foi adicionada sobre o macerado, no papel de filtro, até atingir a brancura. O volume do balão foi completado com acetona pura para 25 mL. As absorbâncias das clorofilas foram lidas a 662 e 645 nm (clorofilas a e b, respectivamente) e a dos carotenoides a 470 nm. As concentrações dos pigmentos foram determinadas de acordo com as equações definidas em Lichtenthaler (1987).

2.6. Delineamento estatístico

O delineamento experimental foi totalmente casualizado. As médias dos parâmetros biométricos das plantas aclimatizadas de T3 e T6 foram submetidas à análise de regressão em função da temperatura de cultivo *in vitro* (10, 15, 20 e 25°C). As médias dos parâmetros biométricos, teor hídrico e dos pigmentos das plantas aclimatizadas a partir de T3 e T6 sob as diferentes temperaturas foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da sobrevivência e do crescimento de plantas de *N. minutum* aclimatizadas *ex vitro*

As plantas mantidas *in vitro* por três ou seis meses (T3 e T6, respectivamente) mostraram capacidade de adaptação satisfatória ao ambiente *ex vitro* após 120 dias de aclimatização (Tabela 1).

A partir de um lote inicial de 80 plantas de cada tratamento térmico (com exceção das 100 plantas aclimatizadas de T6 mantidas a 10°C), apenas dois tratamentos apresentaram a morte de plantas: em T3 mantido a 10°C e 15°C, sendo que neste último somente nas plantas aclimatizadas por 30 dias, e em T6 apenas naquelas crescidas a 10°C e aclimatizadas por 30 dias (Tabela 1). Após esse período, as plantas já apresentavam características de adaptação, pois não ocorreram mortalidades durante as avaliações aos 90 e 120 dias de aclimatização. Tendo em vista o número de plantas mortas observado para T3, decidiu-se ampliar a amostra para 100 plantas em T6, na tentativa de que sobrevivesse um número de plantas as quais pudessem ser avaliadas ao final dos 120 dias.

Tabela 1. Sobrevivência de *Nidularium minutum* após aclimatização a 25°C por 30, 60, 90 e 120 dias de plantas previamente cultivadas *in vitro* por três e seis meses em diferentes temperaturas (10, 15, 20 e 25°C - Controle). Deve-se considerar que a cada coleta são retiradas 20 plantas para as análises.

Tratamentos durante o cultivo <i>in vitro</i>		Lote inicial de plantas aclimatizadas	Coleta após 30 dias		Coleta após 60 dias		Coleta após 90 dias		Coleta após 120 dias	
Tempo	Temperatura (°C)		Plantas Vivas	Plantas Mortas	Plantas Vivas	Plantas Mortas	Plantas Vivas	Plantas Mortas	Plantas Vivas	Plantas Mortas
T3 (3 meses)	25	80	80	0	60	0	40	0	20	0
	20	80	80	0	60	0	40	0	20	0
	15	80	77	3	57	0	37	0	17	0
	10	80	76	4	51	5	27	4	7	0
T6 (6 meses)	25	80	80	0	60	0	40	0	20	0
	20	80	80	0	60	0	40	0	20	0
	15	80	80	0	60	0	40	0	20	0
	10	100	81	19	61	0	41	0	21	0

As figuras 3 e 4 mostram o aspecto geral das plantas aclimatizadas. Não foram verificadas alterações morfológicas tanto para plantas aclimatizadas de T3 como T6, independentemente da temperatura em que estas foram mantidas *in vitro*, demonstrando que a temperatura baixa reduziu o crescimento *in vitro*, contudo não modificou o desenvolvimento das plantas durante a aclimatização. Observou-se que a alteração na coloração (aspecto verde claro) que apareceu durante o cultivo *in vitro* (mencionada no Capítulo 1 – item 3.4) permaneceu apenas para as plantas provenientes da menor temperatura de cultivo *in vitro* (10°C – Figuras 3 e 4).

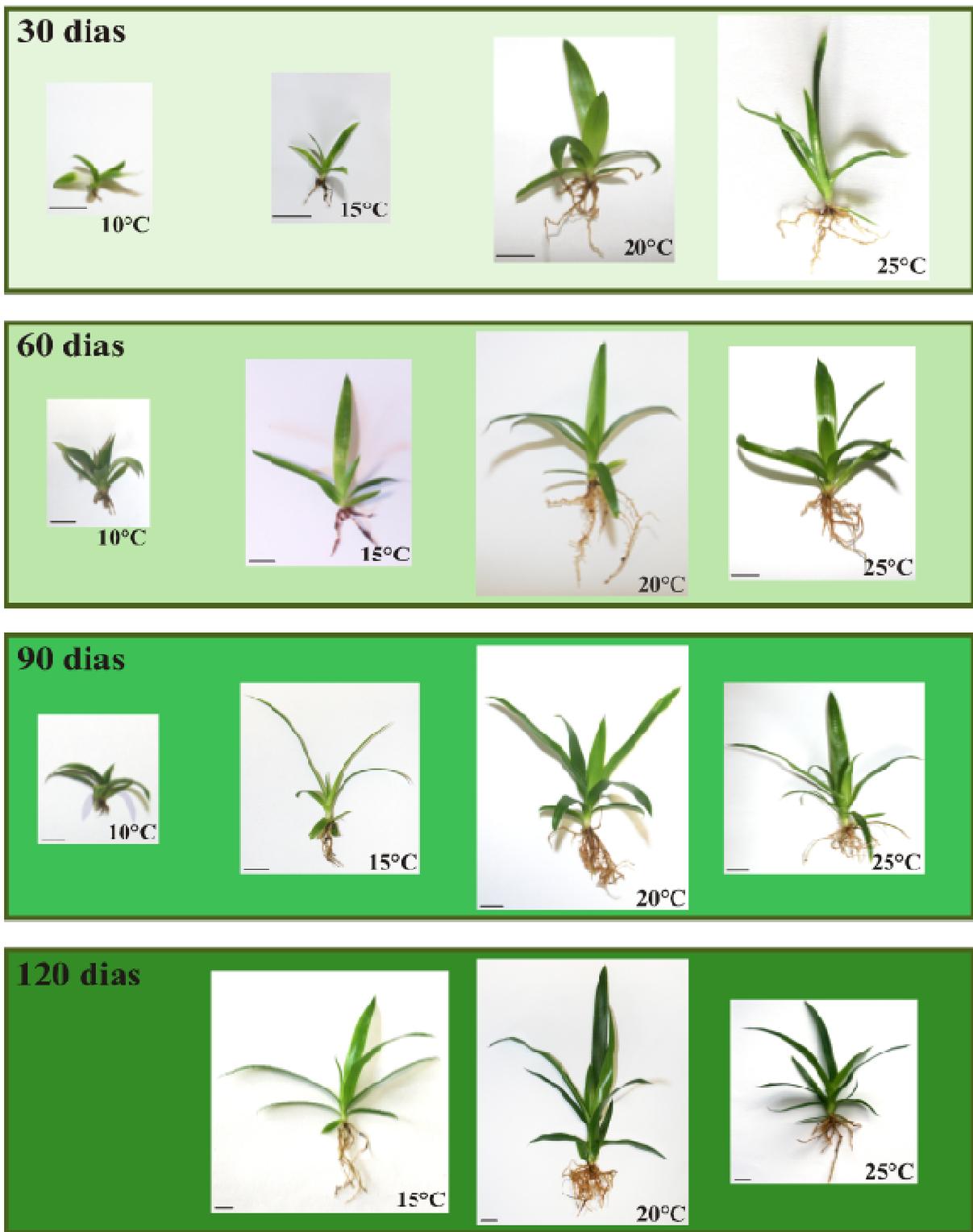


Figura 3. Aspecto das plantas de *Nidularium minutum* aclimatizadas a 25°C por até 120 dias após cultivo *in vitro* por três meses na temperatura de 10, 15, 20 e 25°C – Controle. Barra = 1,0 cm.

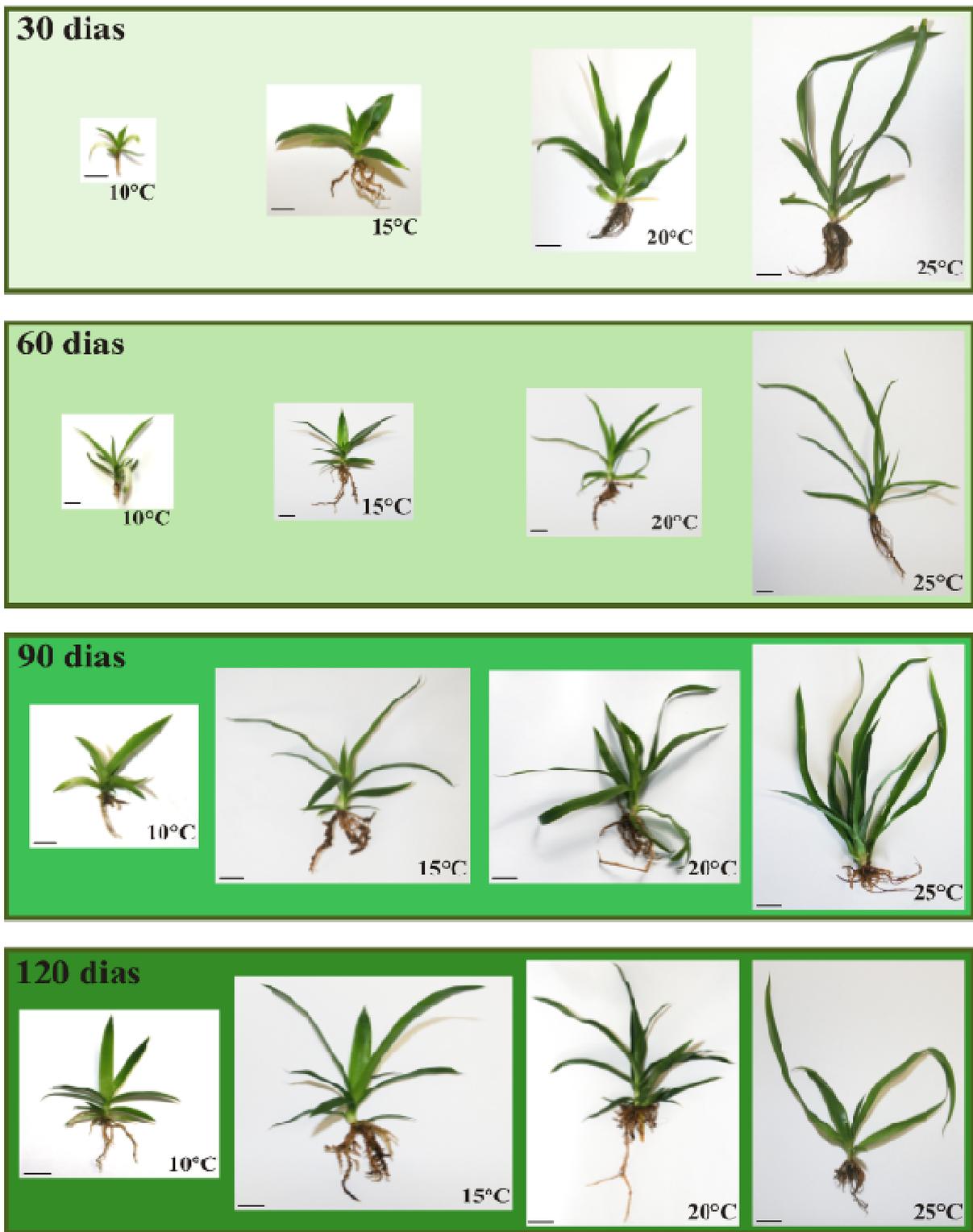


Figura 4. Aspecto das plantas de *Nidularium minutum* aclimatizadas a 25°C por até 120 dias após cultivo *in vitro* por seis meses na temperatura de 10, 15, 20 e 25°C – Controle. Barra = 1,0 cm.

Em relação aos parâmetros biométricos, de modo geral as plantas de T3 e T6 apresentaram aumento dos valores ao longo do tempo (Figuras 5 e 6). As plantas aclimatizadas de T3, provenientes do cultivo a 10°C, mostraram praticamente os mesmos valores ao longo do tempo, sendo que aos 30 dias estes não apresentaram diferenças significativas em comparação com aquelas cultivadas a 15°C, porém após esse período os valores se mostraram menores (Figuras 5 e 6).

Considerando a parte aérea, as plantas aclimatizadas de T3 e T6 tiveram aumento significativo nos valores dos parâmetros ao longo do tempo (Figura 5). Após 120 dias, as plantas de T3 provenientes do tratamento a 15°C não apresentaram diferenças significativas em relação àquelas que vieram do tratamento controle. O número de folhas não mostrou diferenças significativas nas plantas de T6 independentemente da temperatura de cultivo *in vitro* previamente utilizada (Figura 5C). As plantas aclimatizadas de T3 e T6 obtidas do tratamento a 20°C mostraram os maiores valores (Figura 5).

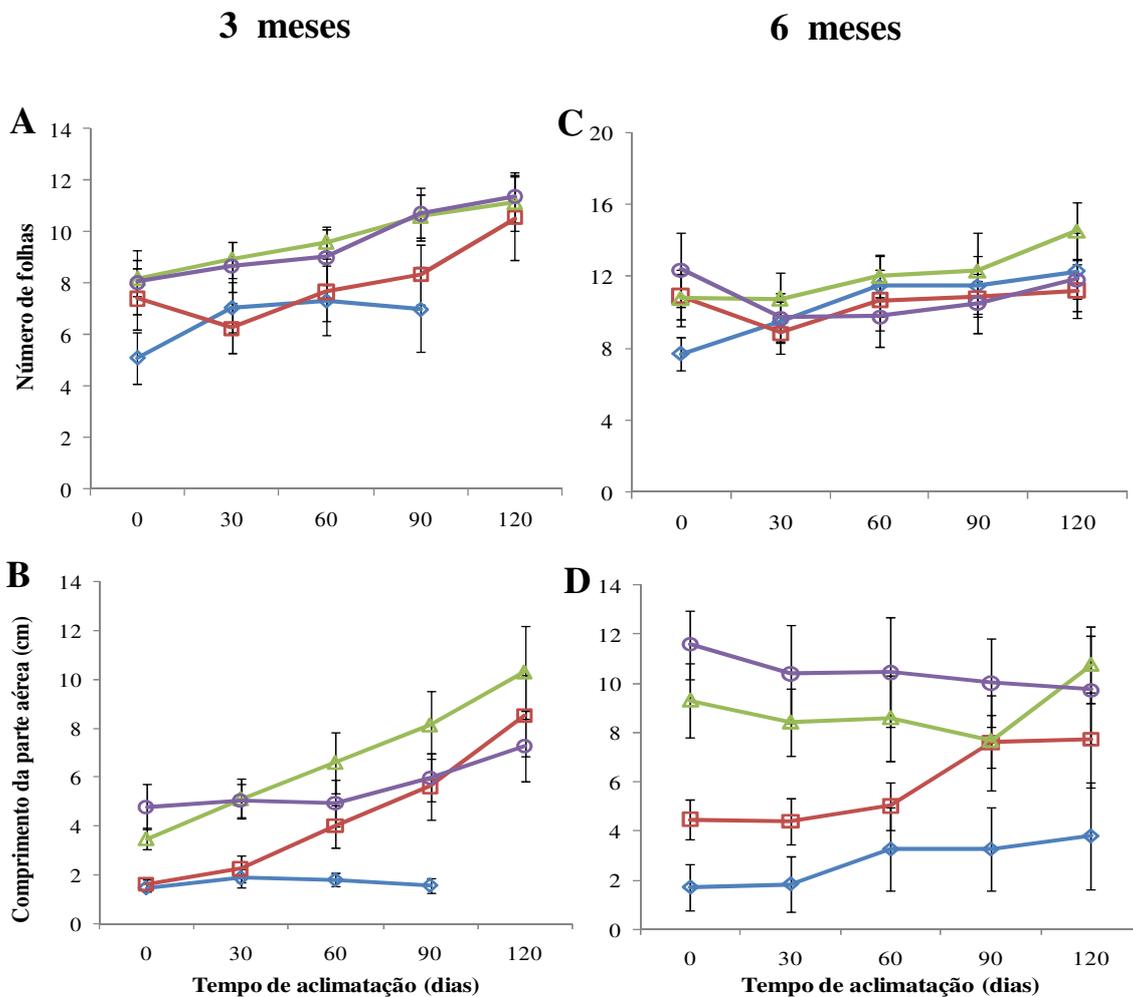


Figura 5. Número (A, C) e comprimento (B, D) da parte aérea de plantas de *Nidularium minutum* aclimatizadas a 25°C por 120 dias provenientes do cultivo *in vitro* por três (A, B) e seis meses (C, D) nas temperaturas de 10°C (◇), 15°C (□), 20°C (△) e 25°C – Controle (○). As barras verticais indicam o desvio padrão. Devido ao número insuficiente de plantas, não foi possível realizar a análise das plantas aclimatizadas por 120 dias da temperatura de 10°C.

Analisando o sistema radicular, as plantas aclimatizadas de T3 obtidas das baixas temperaturas (10 e 15°C) apresentaram os menores valores para o número de raízes (Figura 6A). As plantas aclimatizadas de T6 provenientes de 15°C mostraram valores significativamente maiores do que aquelas que vieram de 10°C (Figura 6C). Não foi realizada a avaliação do número de raízes das plantas aclimatizadas de T6 que cresceram *in vitro* nas temperaturas de 20 e 25°C, pois estas apresentaram o sistema radicular com intensa produção de raízes formando um aglomerado. A tentativa de quantificá-las poderia danificar muitas raízes, subestimando a contagem (Figura 7). Após 120 dias, não houve diferenças significativas para o comprimento da raiz entre os tratamentos, exceto para aquelas provenientes da temperatura de 10°C, que apresentaram os menores valores (Figuras 6B e D).

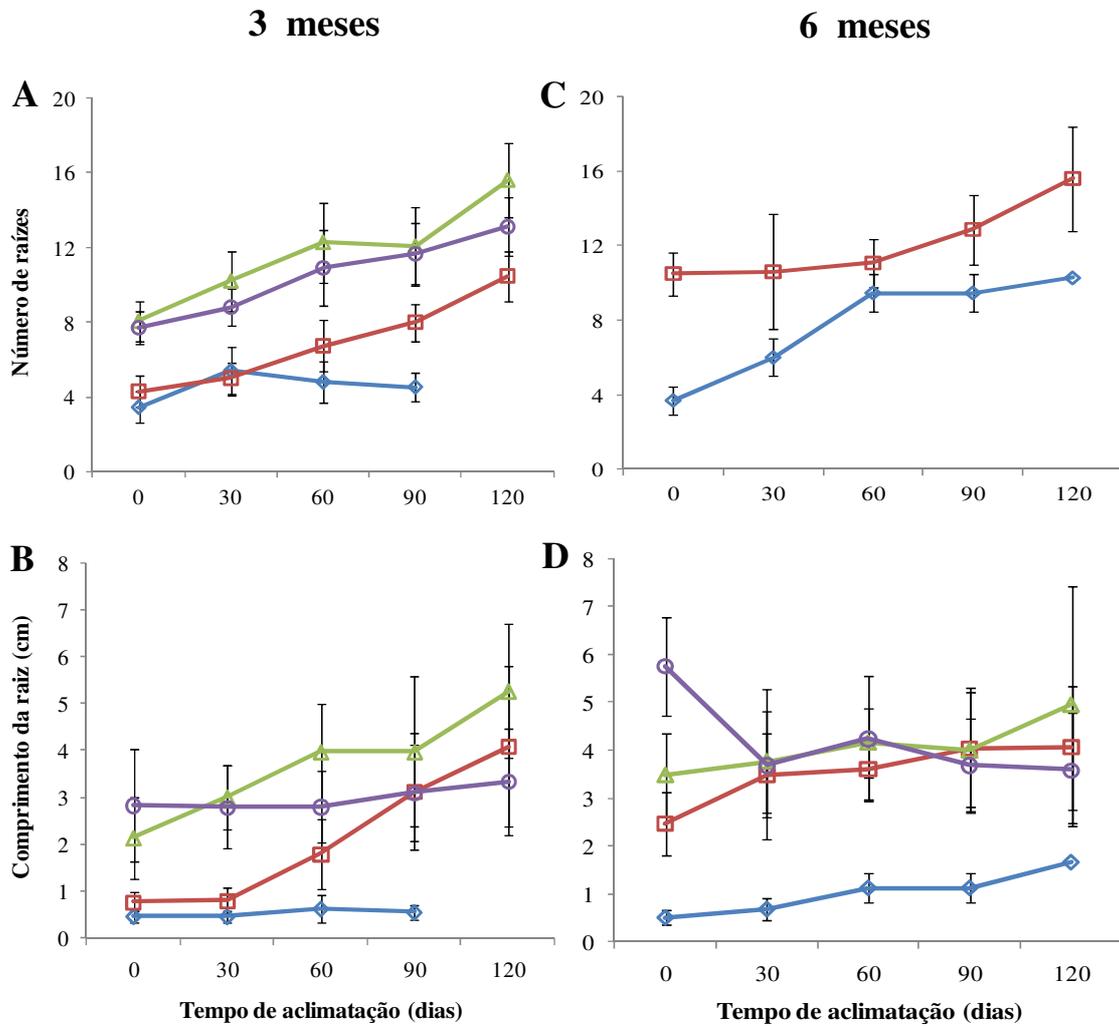


Figura 6. Número (A, C) e comprimento (B, D) de raízes de plantas de *Nidularium minutum* aclimatizadas a 25°C por 120 dias provenientes do cultivo *in vitro* por três (A, B) e seis meses (C, D) nas temperaturas de 10°C (◇), 15°C (□), 20°C (△) e 25°C – Controle (○). As barras verticais indicam o desvio padrão. Devido ao número insuficiente de plantas, não foi possível realizar a análise das plantas aclimatizadas por 120 dias da temperatura de 10°C.



Figura 7. Detalhe do sistema radicular da planta de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por seis meses na temperatura de 25°C (Controle) e posteriormente aclimatizadas na mesma temperatura. Notar o adensamento de raízes. Barra = 1 cm.

Os resultados para massas fresca e seca de plantas aclimatizadas de T3 mostraram para quase todos os tratamentos que, independentemente da temperatura de cultivo *in vitro*, houve aumento nos valores ao longo dos 120 dias de avaliação (Tabela 2). Este aumento foi mais acentuado para as plantas aclimatizadas provenientes da temperatura de 15°C, que apresentaram massas seca da parte aérea e das raízes em torno de 12 vezes maiores aos 120 dias quando comparadas com as de 30 dias. Já aquelas aclimatizadas da temperatura controle (25°C), o aumento na massa seca das plantas foi de cinco vezes (Tabela 2).

Comparando os tratamentos a cada 30 dias, observou-se que as plantas obtidas a 15°C apresentam valores de massa seca iguais àquelas que vieram do controle a partir dos 60 dias, sendo que as plantas aclimatizadas do cultivo *in vitro* a 10°C tiveram os menores valores e as que vieram da temperatura de 20°C apresentaram os maiores.

Foi encontrado elevado conteúdo de água nas plantas aclimatizadas de T3, com valores sempre superiores a 90% (Tabela 2).

Tabela 2. Massas fresca e seca da parte aérea e raiz e teor de água de plantas de *Nidularium minutum* aclimatizadas a 25°C por até 120 dias após o cultivo *in vitro* em diferentes temperaturas (10, 15, 20 e 25°C – Controle) por três meses. Letras distintas na mesma coluna indicam que os dados diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%. (n=3). *dado não avaliado devido ao número insuficiente de plantas.

Temperaturas durante cultivo <i>in vitro</i> (°C)	Tempo de aclimação (dias)	Parte aérea		Raiz		Planta
		Massa Fresca (mg planta ⁻¹)	Massa Seca (mg planta ⁻¹)	Massa Fresca (mg planta ⁻¹)	Massa Seca (mg planta ⁻¹)	Teor de água (%)
25 (controle)	0	109,3d	7,8d	34,7b	3,2c	92b
	30	154,5c	11,70c	19,0c	3,3c	91b
	60	241,0c	12,9c	17,9c	3,0c	94a
	90	390,2b	22,5b	64,2a	6,5b	94a
	120	1159,1a	68,3a	68,9a	12,5a	94a
20	0	88,6d	5,9d	10,0d	1,5e	92c
	30	352,8c	16,1c	28,8c	3,6d	95a
	60	399,0c	27,8c	43,6b	7,2c	93b
	90	582,5b	51,7b	53,1b	26,6a	92c
	120	1320,0a	84,5a	134,6a	21,1b	94b
15	0	31,3d	1,8d	2,8d	0,4c	94a
	30	56,9c	2,8c	4,6c	0,7c	94a
	60	139,6bc	6,2b	10,1b	1,9bc	96a
	90	215,7b	9,0b	34,9ab	4,6ab	96a
	120	797,1a	36,5a	66,6a	7,7a	95a
10	0	15,3c	0,7c	1,8b	0,2b	95a
	30	33,4b	2,5b	1,8b	0,3b	92b
	60	44,1a	3,9a	3,3a	0,6a	91b
	90	38,0ab	3,9a	2,9b	0,2c	90b
	120	*	*	*	*	*

Para as plantas aclimatizadas de T6, também foi verificado aumento nos valores das massas fresca e seca após 120 dias (Tabela 3). As plantas aclimatizadas da temperatura de 15°C apresentaram as massas seca da parte aérea e raízes em torno de quatro vezes maior aos

120 dias em relação aos 30 dias, enquanto aquelas provenientes das outras temperaturas *in vitro* mostraram um aumento em torno de três vezes.

Analisando os tratamentos a cada 30 dias, as plantas aclimatizadas obtidas do cultivo *in vitro* a 15°C apresentaram os valores de massa seca similares aos daquelas aclimatizadas do tratamento controle já a partir dos 30 dias, enquanto as plantas aclimatizadas crescidas *in vitro* a 10°C tiveram os menores valores e aquelas aclimatizadas da temperatura de 20°C mostraram os maiores valores.

À semelhança do observado para T3, o conteúdo de água se mostrou elevado para as plantas de T6, independentemente da temperatura de cultivo *in vitro* previamente utilizada (Tabela 3).

Tabela 3. Massas fresca e seca da parte aérea e raiz e teor de água de plantas de *Nidularium minutum* aclimatizadas a 25°C por até 120 dias após cultivo *in vitro* em diferentes temperaturas (10, 15, 20 e 25°C – Controle) por seis meses. Letras distintas na mesma coluna indicam que os dados diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%. ($n=3$).

Temperaturas durante cultivo <i>in vitro</i> (°C)	Tempo de aclimação (dias)	Parte aérea		Raiz		Planta
		Massa Fresca (mg planta ⁻¹)	Massa Seca (mg planta ⁻¹)	Massa Fresca (mg planta ⁻¹)	Massa Seca (mg planta ⁻¹)	Teor de água (%)
25 (controle)	0	1181,7a	56,1a	503,0a	25,4a	95a
	30	118,7c	15,5c	31,73c	6,50b	87c
	60	363,9bc	43,1b	40,38c	8,13b	88b
	90	451,3b	37,6b	65,67b	10,30b	92b
	120	512,3b	45,6b	57,47b	10,35b	90b
20	0	311,7c	20,8d	103,7c	7,7d	92a
	30	789,9b	60,0c	75,4d	13,7c	92a
	60	1257,8b	104,1b	192,1a	24,8a	92a
	90	1193,9b	89,5bc	114,8b	18,6b	93a
	120	3011,2a	199,6a	143,3b	23,1a	93a
15	0	159,0c	14,9c	36,7c	5,1c	90b
	30	252,1c	17,1c	39,1c	5,5c	93a
	60	418,3b	26,6b	70,5bc	11,3b	94a
	90	812,4a	48,5a	76,2b	12,8b	94a
	120	879,0a	54,0a	252,1a	17,1a	94a
10	0	32,0d	1,6d	0,9d	0,2d	94b
	30	57,1c	2,7c	2,9c	0,5c	95a
	60	85,3b	5,5b	5,2b	0,9bc	93b
	90	105,2b	6,4b	8,0a	1,2b	94b
	120	171,4a	12,4a	9,5a	2,4a	93b

A partição da biomassa das plantas aclimatizadas mostrou maior investimento na parte aérea em relação à raiz (Tabela 4). De modo geral, as plantas aclimatizadas provenientes do cultivo *in vitro* a 10°C, tanto de T3 como de T6, apresentaram os maiores valores para a parte aérea e os menores para a raiz, quando comparadas com aquelas aclimatizadas de outros

tratamentos térmicos. Já as plantas aclimatizadas provenientes das outras temperaturas mostraram valores similares aos encontrados para as plantas que vieram da temperatura controle (25°C) (Tabela 4).

Tabela 4. Partição da biomassa (calculada com base na massa seca) da parte aérea e de raízes, em porcentagem, de plantas de *Nidularium minutum* aclimatizadas a 25°C por 30, 60, 90 e 120 dias provenientes do cultivo *in vitro* por três e seis meses em diferentes temperaturas (10, 15, 20 e 25°C - Controle). *dado não avaliado devido ao número insuficiente de plantas.

Temperaturas durante cultivo <i>in vitro</i> (°C)	Tempo de Aclimação (dias)	Tempo de cultivo <i>in vitro</i>			
		3 meses		6 meses	
		Parte aérea (%)	Raiz (%)	Parte aérea (%)	Raiz (%)
25 (controle)	0	71	29	69	31
	30	78	22	70	30
	60	81	19	84	16
	90	77	23	78	22
	120	85	15	81	19
20	0	79	21	73	27
	30	82	18	69	31
	60	80	20	58	42
	90	66	34	83	17
	120	80	20	90	10
15	0	83	17	74	26
	30	80	20	72	28
	60	76	24	83	17
	90	66	34	79	21
	120	83	17	83	17
10	0	78	22	87	13
	30	89	11	84	16
	60	88	13	86	14
	90	96	4	84	16
	120	*	*	82	18

A Taxa Relativa de Crescimento (TCR) da parte aérea para as plantas aclimatizadas de T3 mostrou maior crescimento aos 30 dias de aclimatização, principalmente para as plantas provenientes da temperatura de 10°C (Tabela 5). Já para aquelas aclimatizadas de T6, o maior crescimento aos 30 dias ocorreu também para as plantas que foram cultivadas *in vitro* a 10°C e para a massa seca das plantas obtidas da temperatura de 20°C (Tabela 5). Após 120 dias, as plantas de T3 aclimatizadas da temperatura de 15°C apresentaram o maior crescimento em relação aos outros tratamentos, enquanto para aquelas de T6 foram as obtidas da temperatura de 10°C (Tabela 5).

Semelhante à parte aérea, para a TCR do sistema radicular também foi encontrado os maiores valores na primeira coleta (Tabela 6). Durante o período de aclimatização, para as plantas de T3 foram observados os maiores valores para as plantas provenientes da temperatura de 15°C, já para aquelas de T6 os maiores foram obtidos das plantas da temperatura de 10°C (Tabela 6).

Tabela 5. Taxa de Crescimento Relativo (TCR) da parte aérea de plantas de *Nidularium minutum* aclimatizadas a 25°C por 30, 60, 90 e 120 dias previamente cultivadas *in vitro* por três e seis meses em diferentes temperaturas (10, 15, 20 e 25°C - Controle). *dado não avaliado devido ao número insuficiente de plantas.

Temperaturas durante cultivo <i>in vitro</i> (°C)	Tempo de aclimatização (dias)	Tempo de cultivo <i>in vitro</i>					
		3 meses			6 meses		
		Número de folhas	Comprimento (cm)	Massa Seca (mg planta ⁻¹)	Número de folhas	Comprimento (cm)	Massa Seca (mg planta ⁻¹)
25 (controle)	30	0,002	0,002	0,013	0,000	0,000	0,000
	60	0,001	0,000	0,002	0,000	0,000	0,017
	90	0,002	0,002	0,006	0,001	0,002	0,000
	120	0,000	0,002	0,009	0,001	0,002	0,018
20	30	0,004	0,013	0,034	0,000	0,000	0,035
	60	0,001	0,004	0,009	0,002	0,000	0,009
	90	0,001	0,002	0,007	0,000	0,000	0,000
	120	0,000	0,002	0,004	0,001	0,003	0,001
15	30	0,004	0,011	0,012	0,000	0,000	0,005
	60	0,004	0,009	0,013	0,003	0,002	0,000
	90	0,001	0,004	0,006	0,000	0,005	0,007
	120	0,019	0,017	0,010	0,000	0,000	0,001
10	30	0,023	0,008	0,043	0,022	0,002	0,018
	60	0,001	0,000	0,007	0,004	0,006	0,012
	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002
	120	*	*	*	0,001	0,001	0,006

Tabela 6. Taxa de Crescimento Relativo (TCR) do sistema radicular de plantas de *Nidularium minutum* aclimatizadas a 25°C por 30, 60, 90 e 120 dias previamente cultivadas *in vitro* por três e seis meses em diferentes temperaturas (10, 15, 20 e 25°C - Controle). *dado não avaliado devido ao número insuficiente de plantas.

Temperaturas durante cultivo <i>in vitro</i> (°C)	Tempo de aclimatização (dias)	Tempo de cultivo <i>in vitro</i>					
		3 meses			6 meses		
		Número de raízes	Comprimento (cm)	Massa Seca (mg planta ⁻¹)	Número de raízes	Comprimento (cm)	Massa Seca (mg planta ⁻¹)
25 (controle)	30	0,004	0,000	0,001	-	0,000	0,000
	60	0,004	0,000	0,000	-	0,002	0,004
	90	0,001	0,001	0,009	-	0,000	0,003
	120	0,001	0,001	0,005	-	0,001	0,000
20	30	0,008	0,011	0,029	-	0,003	0,042
	60	0,003	0,005	0,011	-	0,002	0,017
	90	0,000	0,000	0,015	-	0,000	0,000
	120	0,002	0,002	0,000	-	0,002	0,002
15	30	0,004	0,003	0,029	0,000	0,011	0,008
	60	0,006	0,012	0,017	0,001	0,001	0,000
	90	0,002	0,006	0,000	0,002	0,001	0,009
	120	0,019	0,011	0,018	0,002	0,000	0,000
10	30	0,015	0,000	0,013	0,016	0,010	0,025
	60	0,000	0,005	0,010	0,005	0,007	0,010
	90	0,000	0,000	0,000	0,002	0,001	0,003
	120	*	*	*	0,001	0,003	0,006

Os gráficos das figuras 8 e 9 indicam o crescimento de *N. minutum* aclimatizadas a 25°C por 120 dias após ser cultivada *in vitro* em diferentes tratamentos (tempo de permanência e variação na temperatura), com as respectivas equações ajustadas pela análise de regressão e a significância das mesmas, indicada pela análise de variância.

Com o aumento da temperatura *in vitro*, houve aumento significativo nos valores dos parâmetros biométricos da parte aérea para as plantas aclimatizadas de T3 até os 120 dias, com exceção do comprimento (Figuras 8A-D). A tendência de crescimento foi predominantemente linear aos 30 e 120 dias de aclimatização e quadrática aos 60 e 90 dias.

Para as plantas aclimatizadas de T6, a análise de variância da regressão não mostrou tendência significativa para o número de folhas aos 30 e 90 dias, indicando que o aumento da temperatura de cultivo *in vitro* não influenciou no crescimento deste parâmetro nesses períodos. A tendência de crescimento para as plantas aclimatizadas de T6 foi predominantemente linear para o número de folhas e comprimento da parte aérea, sendo quadrática para as massas fresca e seca (Figuras 8 E-H). O comprimento da parte aérea atingiu seu valor máximo aos 120 dias na temperatura de 15°C, decrescendo nas temperaturas de 20 e 25°C (Figuras 8B e F).

A tendência de crescimento para o sistema radicular das plantas aclimatizadas de T3 e de T6 a partir de diferentes temperaturas *in vitro* foi predominantemente linear para aquelas de T3 e quadrático para as plantas de T6 (Figura 9).

Para as plantas aclimatizadas de T3, após 120 dias o comprimento da raiz atingiu seu valor máximo após o cultivo *in vitro* na temperatura de 15°C, decrescendo para aquelas provenientes das temperaturas de 20 e 25°C (Figura 9A). Não houve tendência significativa de crescimento para a massa fresca (Figura 9B). As massas fresca e seca das plantas aclimatizadas de T6 por 60 dias apresentaram o maior crescimento naquelas provenientes da temperatura de 20°C, sendo que este decaiu nas plantas obtidas da temperatura de 25°C (Figuras 9E e F).

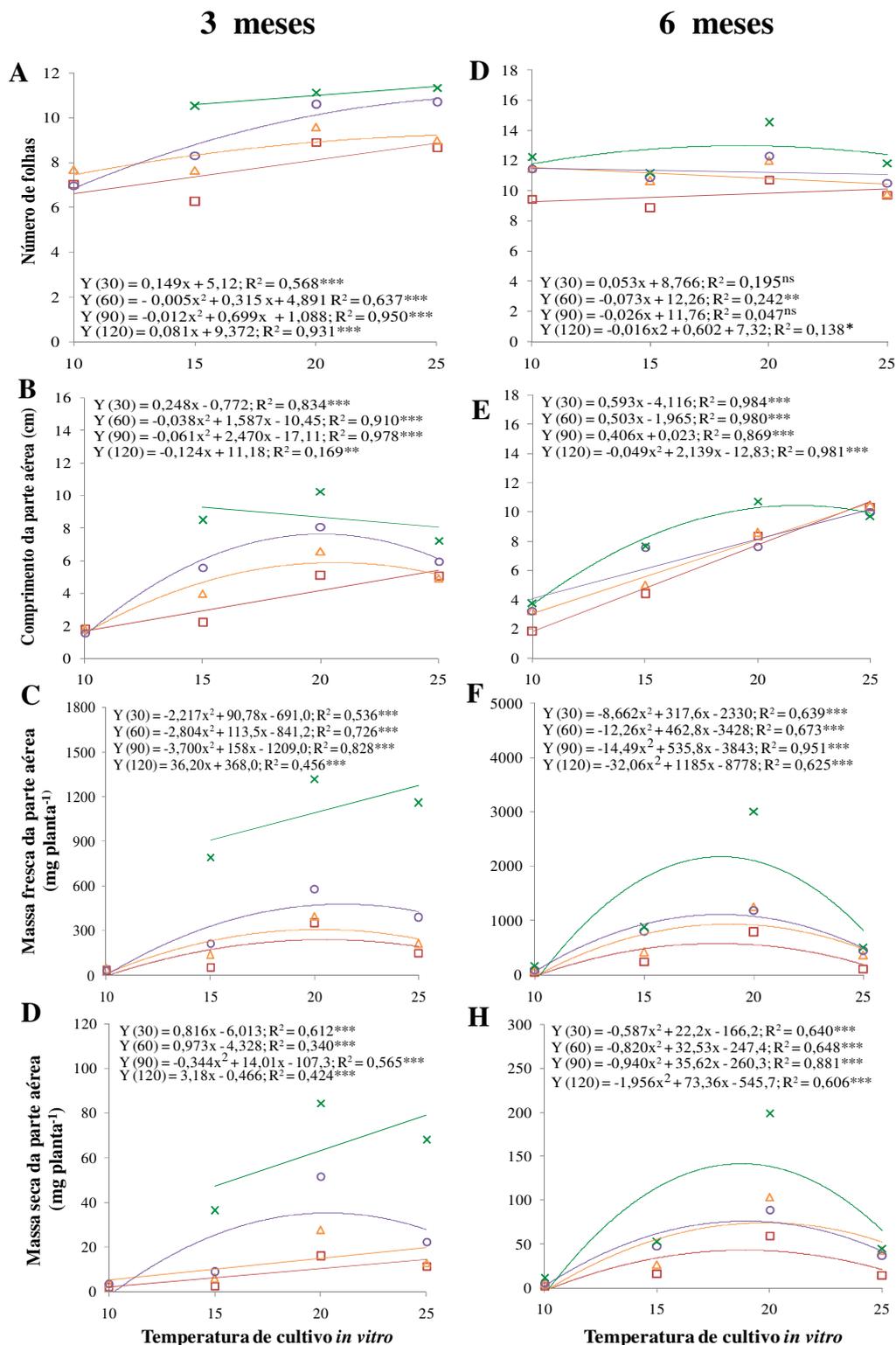


Figura 8. Crescimento da parte aérea de plantas de *Nidularium minutum* provenientes do cultivo *in vitro* por três (A, B, C, D) e seis meses (E, F, G, H) em função da temperatura *in vitro* (10, 15, 20 e 25°C – Controle) e aclimatizada a 25°C por 30 dias (Y(30) - □), 60 dias (Y(60) - △), 90 dias (Y(90) - ○) e 120 dias (Y(120) - ×). (A, E) Número de folhas. (B, F) Comprimento. (C, G) Massa fresca. (D, H) Massa seca. ns = não significativo ($\alpha > 0,05$), * = significativo a 5% ($\alpha \leq 0,05$), ** = significativo a 1% ($\alpha \leq 0,01$), *** = significativo a 0,1% ($\alpha \leq 0,001$). Devido ao número insuficiente de plantas, não foi possível realizar a análise das plantas aclimatizadas por 120 dias da temperatura de 10°C.

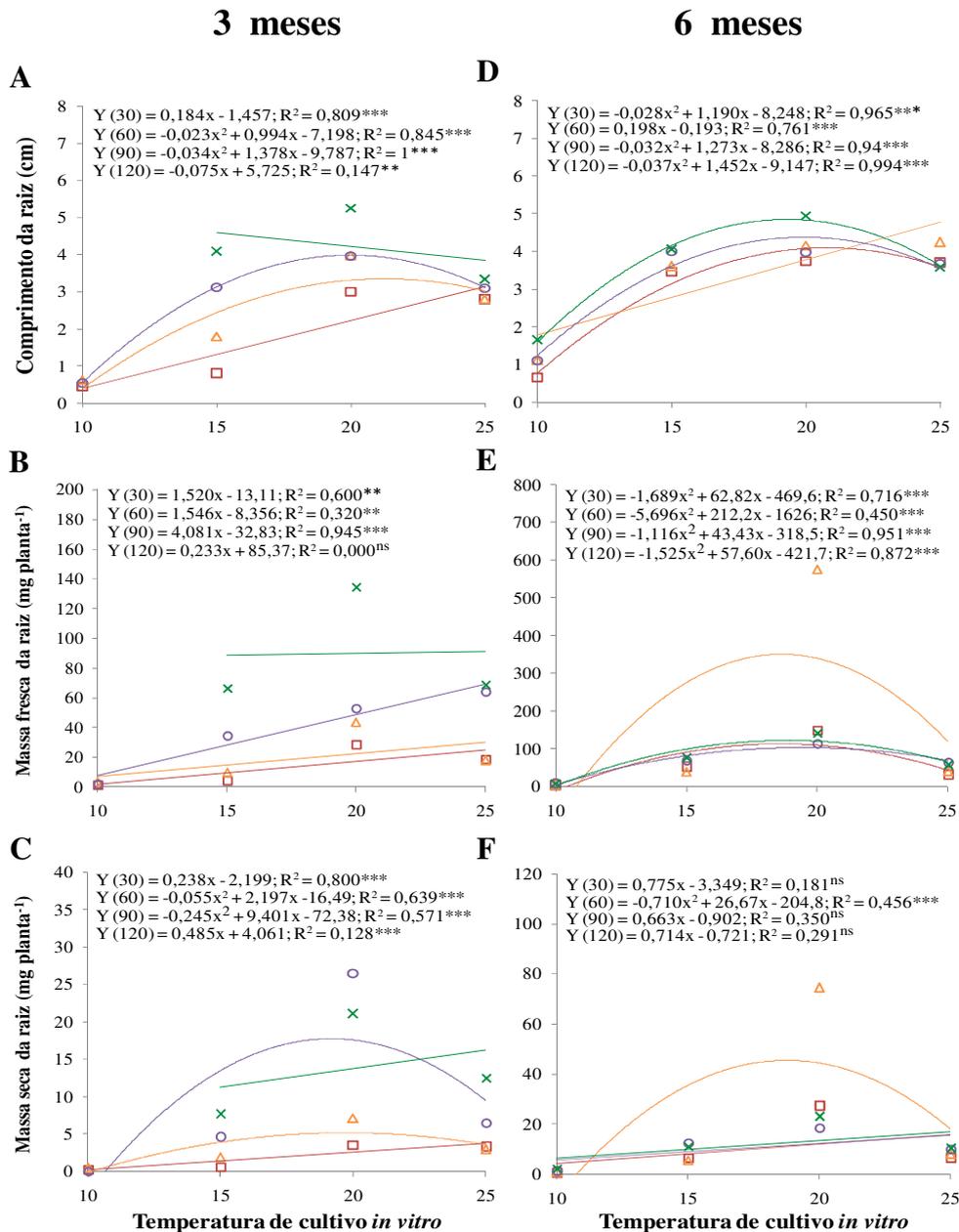


Figura 9. Crescimento do sistema radicular de plantas de *Nidularium minutum* provenientes do cultivo *in vitro* por três (A, B, C) e seis meses (D, E, F) em função da temperatura *in vitro* (10, 15, 20 e 25°C – Controle) e aclimatizadas a 25°C por 30 dias (Y(30) -□), 60 dias (Y(60) -△), 90 dias (Y(90) -○) e 120 dias (Y(120) -x). (A, D) Comprimento. (B, E) Massa fresca. (C, F) Massa seca. ns = não significativo ($\alpha > 0,05$), * = significativo a 5% ($\alpha \leq 0,05$), ** = significativo a 1% ($\alpha \leq 0,01$), *** = significativo a 0,1% ($\alpha \leq 0,001$). Devido ao número insuficiente de plantas, não foi possível realizar a análise das plantas aclimatizadas por 120 dias da temperatura de 10°C.

3.2. Teor de clorofila e de carotenoides em plantas de *N. minutum* aclimatizadas *ex vitro*

Para as plantas aclimatizadas provenientes de T3, não houve diferença entre o conteúdo de clorofilas e carotenoides, independentemente da temperatura de cultivo *in vitro* utilizada (Figura 10).

Já para aquelas aclimatizadas de T6, as plantas crescidas a 20°C apresentaram os maiores valores, enquanto que naquelas mantidas a 15°C e na temperatura controle (25°C) não foram observadas diferenças significativas. O menor conteúdo de pigmentos fotossintéticos ocorreu para as plantas que foram obtidas do tratamento a 10°C (Figura 10).

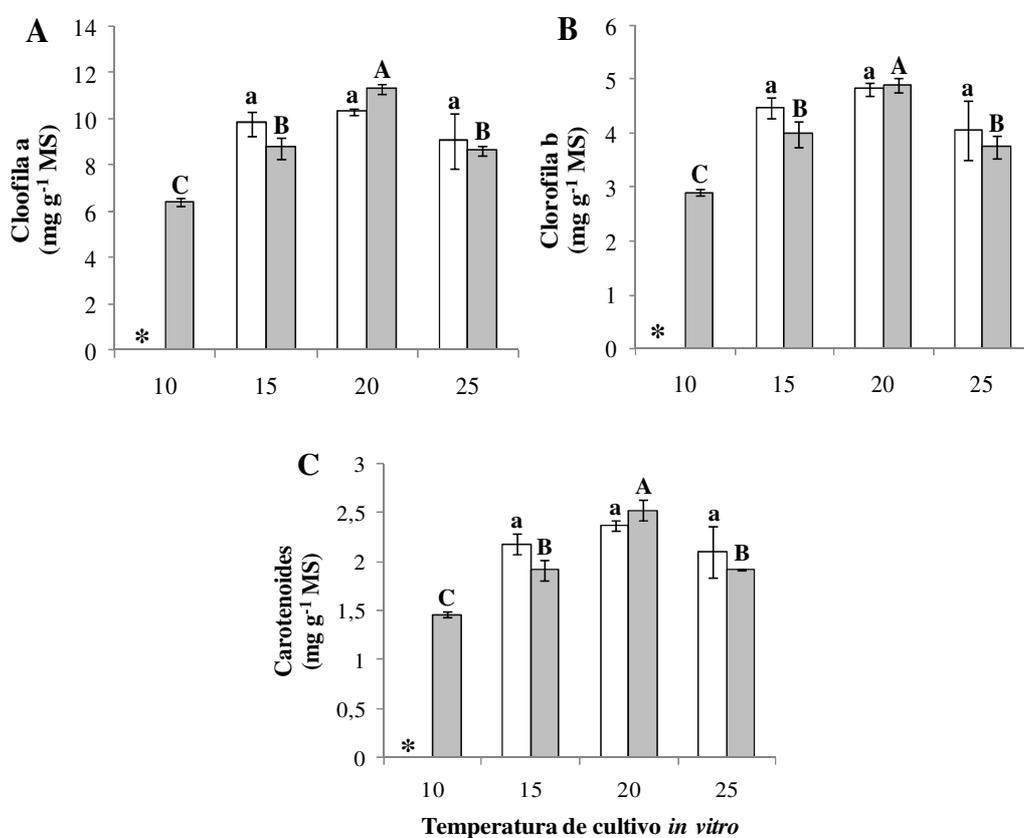


Figura 10. Conteúdo de clorofilas (A, B) e carotenoides (C) de plantas de *Nidularium minutum* aclimatizadas a 25°C por 120 dias após cultivo *in vitro* por três (*coluna branca*) e seis meses (*coluna cinza*) em diferentes temperaturas (10, 15, 20 e 25°C - Controle). As barras verticais indicam o desvio padrão. Letras minúsculas comparam valores de plantas crescidas por três meses *in vitro* nas diferentes temperaturas e posteriormente aclimatizadas a 25°C por 120 dias e letras maiúsculas comparam valores de plantas crescidas por seis meses *in vitro* e posteriormente aclimatizadas nestas mesmas condições pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%. *dado não avaliado devido ao número insuficiente de plantas.

Conforme descrito no Capítulo 1, as plantas crescidas *in vitro* nas temperaturas de 10 e 15°C por três meses apresentaram coloração verde clara nas folhas mais novas, sendo que esta característica permaneceu aos seis meses apenas nas plantas mantidas a 10°C (Figura 4, Capítulo 1). Nas plantas crescidas nas outras temperaturas não foi observada essa característica.

Após a aclimatização a 25°C, não houve o aparecimento de folhas com coloração verde clara e nas existentes, gradualmente foram surgindo pontos de pigmentação verde escuro (Figuras 3 e 4). A cada avaliação das plantas aclimatizadas, a porcentagem de folhas com coloração verde clara diminuía. Tanto para as plantas de T3 como as de T6 que vieram da temperatura de 10°C, a cada 30 dias houve a redução de cerca da metade da porcentagem das folhas com coloração verde clara em relação ao período anterior, e para aquelas que cresceram a 15°C praticamente não houve mais folhas com coloração verde clara (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem de folhas com coloração verde clara de plantas de *Nidularium minutum* aclimatizadas a 25°C por 30, 60, 90 e 120 dias após serem cultivadas *in vitro* por três e seis meses em diferentes temperaturas (10, 15, 20 e 25°C – Controle). *dado não avaliado devido ao número insuficiente de plantas. - não detectado.

Tratamentos durante cultivo <i>in vitro</i>			Plantas Aclimatadas			
			Folhas com coloração verde clara (%)			
Tempo (meses)	Temperatura (°C)	Folhas com coloração verde clara (%)	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
T3 (3 meses)	25	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-
	15	29	0,2	-	-	-
	10	30	20	13	7	*
T6 (6 meses)	25	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-
	10	36	17	15	7	3

4. DISCUSSÃO

A aclimatização a 25°C de *Nidularium minutum*, após cultivo *in vitro* em baixas temperaturas, apresentou elevada taxa de sobrevivência das plantas durante 120 dias (Tabela 1), o que é essencial para o sucesso do sistema de cultivo *in vitro* (Hung *et al.* 2011). Estes resultados demonstram ser este método prático para a produção comercial e a conservação de germoplasma dessa espécie. Uma taxa de 100% de sobrevivência durante a aclimatização também foi relatada para a bromélia *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra, que foi mantida por dois anos a 15°C, transferida para 28°C por um ano e posteriormente aclimatizada (Pedroso *et al.* 2010). Outros trabalhos também evidenciaram que a exposição ao frio durante o cultivo *in vitro* pode facilitar a aclimatização das plantas (Cheyne & Dale 1980, Pereira & Fortes 2000, Tadesse *et al.* 2000, Hoffmann *et al.* 2001, Negash *et al.* 2001, Pereira *et al.* 2001, Malik *et al.* 2009, Lata *et al.* 2010).

As plantas aclimatizadas da temperatura de 10°C, tanto de T3 como de T6, mostraram os menores valores para os parâmetros biométricos analisados. Em *Vriesea inflata*, plantas cultivadas *in vitro* a 15°C por dois anos, transferidas para a temperatura de 28°C por um ano e posteriormente aclimatizadas por três meses também apresentaram menor comprimento da folha quando comparadas com plantas aclimatizadas da temperatura de 28°C constantes, entretanto não foram encontradas diferenças entre o número de folhas (Pedroso *et al.* 2010), características também observadas para *N. minutum* de T6 provenientes da temperatura de 10°C (Figuras 5A e C), sugerindo que o número de folhas seja um parâmetro pouco influenciado pela temperatura.

A formação das raízes de *N. minutum* durante o cultivo *in vitro* nas diferentes temperaturas colaborou para o sucesso da aclimatização, pois a presença e o grau de desenvolvimento das raízes são fatores limitantes, já que as plantas irão depender da capacidade de absorção de nutrientes e água para sobreviver a essa nova condição (Aoyama *et al.* 2012), principalmente para esta espécie, uma bromélia terrestre. Houve um aumento do sistema radicular ao longo do período de aclimatização para as plantas de T3 e T6 (Figura 6), como também ocorreu para o milho (*Zea mays* (L.) var. Alexander) com o aumento da temperatura de 13 para 25°C (Nagel *et al.* 2009). Os valores do comprimento da raiz foram sempre menores para as plantas aclimatizadas obtidas do cultivo a 10°C, o que pode ter influenciado na menor sobrevivência destas plantas durante a aclimatização (Tabela 1).

Um fator que pode favorecer o crescimento das raízes é o estado físico do substrato. No cultivo *in vitro* o meio utilizado é em geral semi-sólido, com o uso de ágar para dar consistência, interferindo positivamente na disponibilidade de água, nutrientes e outras

substâncias para as plantas (Grattapaglia & Machado 1998). Diferentemente, o uso da casca de *Pinus* como substrato para as plantas aclimatizadas apresenta outro estado físico, além da menor capacidade de retenção de água e maior porosidade, quando tal substrato é comparado com o meio de cultura gelificado, interferindo na disponibilidade de água, nutrientes e nos níveis de oxigênio para as plantas. O uso deste substrato se mostrou eficiente na aclimatização de *N. minutum* e também das bromélias *Vriesea inflata* (Pedroso *et al.* 2010) e *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Aoyama *et al.* 2012).

Apesar da redução do crescimento *in vitro* devido à temperatura de 15°C descrito no Capítulo 1, nas plantas aclimatizadas de T3 e T6 após 120 dias foram encontrados valores similares aos das plantas aclimatizadas da temperatura controle, para quase todos os parâmetros analisados (Figuras 5 e 6). Logo, o investimento no crescimento destas plantas foi maior do que aquele das plantas aclimatizadas da temperatura de 25°C. O efeito positivo do frio também foi verificado na aclimatização de plantas de batatas (*Solanum tuberosum* L.) cultivadas *in vitro* nas temperaturas de 17, 20 e 26°C, com maior área foliar para as plantas obtidas das temperaturas menores durante o período de aclimatização de 13 dias (Tadesse *et al.* 2000) e para macieiras cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh.), que apresentou aumento na altura das plantas aclimatizadas após o cultivo *in vitro* a 4°C (Pereira & Fortes 2000).

Com relação aos dados de massa, tanto fresca como seca, das raízes e da parte aérea, houve quase sempre acréscimo ao longo do tempo de aclimatização (Tabelas 2 e 3). Plantas de macieiras aclimatizadas provenientes do cultivo *in vitro* a 4°C apresentaram aumento na massa seca das raízes e parte aérea proporcional ao tempo de permanência nesta temperatura (Pereira & Fortes 2000). Ao se comparar a idade das plantas de T3 e T6 provenientes da temperatura de 15°C, verificou-se que as plantas que foram aclimatizadas por 120 dias de T3 tinham a mesma idade das que foram aclimatizadas por 30 dias de T6 (ambos os lotes com oito meses). As primeiras apresentaram valores mais elevados que as de T6, tanto de massas fresca e seca da parte aérea e raízes (Tabelas 2 e 3), indicando que o menor tempo de permanência *in vitro* pode permitir maior crescimento na condição *ex vitro*. Esse resultado pode sugerir o tempo mais adequado para a produção mais rápida de mudas.

O aumento da massa fresca sugere que não houve estresse hídrico pela mudança de substrato de cultivo, como observado na análise do teor de água, que foi sempre elevado para todas as plantas aclimatizadas de T3 e T6, com o valor mínimo de 87% (Tabelas 2 e 3). Desse modo, houve manutenção no teor hídrico das plantas, pois este já era elevado durante o cultivo *in vitro* (Capítulo 1), o que pode ter favorecido a sobrevivência de *N. minutum* quando transferida para condições *ex vitro*.

Mecanismos de controle da perda de água são essenciais para as plantas devido a menor umidade relativa existente nas condições *ex vitro*. Na aclimatização de duas espécies de cactos (*Obregonia denegrii* Fric. e *Coryphantha minima* Baird), mesmo com perda de água significativa, sua sobrevivência não foi afetada, sugerindo que sua suculência tenha permitido a sobrevivência depois de certo grau de desidratação (Malda *et al.* 1999). A anatomia de folhas de *N. minutum in vitro* mostrou a presença de parênquima aquífero (Figuras 11 e 12 – Capítulo 1), com uma espessura maior nas plantas cultivadas em baixas temperaturas (10 e 15°C) (Tabela 4 – Capítulo 1). Este tecido tem a função de armazenamento de água (Evert 2006), e sua presença em maior quantidade nas plantas provenientes das baixas temperaturas pode ter colaborado com a hidratação destas durante a aclimatização. A sobrevivência na transferência *ex vitro* da planta medicinal *Rheum emodi* Wall., depois de cultivada *in vitro* na temperatura de 15°C, foi atribuída ao aumento do número de feixes vasculares induzido pela baixa temperatura, que levou ao transporte mais eficiente de água durante o estabelecimento em condições de estufa (Malik *et al.* 2009).

Alta umidade e proteção são necessárias para os estados iniciais do processo de aclimatização, além de ser importante prevenir o superaquecimento e a alta radiação solar nas plantas, sendo frequentemente necessário o uso de sombreamento quando colocadas em casa de vegetação (George 1996). Por isso, este autor sugere o uso de plástico ou vidro como cobertura durante a aclimatização. Para a bromélia *Vriesea inflata*, assim como para *N. minutum*, foi utilizado plástico sobre as bandejas e as plantas estavam em um ambiente com radiação menor e temperatura controlada (28 e 25°C, respectivamente) (Pedroso *et al.* 2010), fatores que também podem ter contribuído para o sucesso da aclimatização. Além disso, o fornecimento de adubação adequada, como a utilizada neste trabalho, se mostrou eficiente para *N. minutum*, assim como para as bromélias *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker (Tamaki *et al.* 2011), *Alcantarea imperialis* (Tamaki *et al.* 2011) e *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch (Santos *et al.* 2010). A formulação dos adubos normalmente utilizados na aclimatização de bromélias contém comumente nitrogênio, fósforo e potássio, já o MS/2 apresenta também outros macronutrientes, como cálcio e enxofre, o que pode ter otimizado o crescimento em estufa destas plantas (Tamaki *et al.* 2011).

Ao se considerar a partição da biomassa nas plantas aclimatizadas, foi verificada maior porcentagem na parte aérea do que nas raízes, independentemente do tempo e tratamento térmico *in vitro* (Tabela 4). Essa relação também foi encontrada para a bromélia *Alcantarea imperialis*, que foi aclimatizada após o cultivo *in vitro* a 25°C e verificado que cerca de 80% da biomassa foi alocada para a parte aérea (Aoyama 2010).

Durante o cultivo *in vitro* de *N. minutum*, foi relatado redução nos valores de biomassa das raízes nas temperaturas de 10°C, tanto nas plantas de T3 e T6, e de 15°C apenas para as provenientes de T3 em relação às plantas controle (25°C) (Tabela 2 - Capítulo 1). Após a aclimatização, foi verificado aumento na porcentagem de raízes nas plantas de T3 obtidas da temperatura de 15°C, porém para aquelas aclimatizadas provenientes de 10°C ainda se manteve biomassa menor quando comparadas com as aclimatizadas dos outros tratamentos térmicos (Tabela 4). Logo, o aumento da temperatura favoreceu o maior investimento nas raízes, podendo ter auxiliado na aclimatização das plantas. Uma redução drástica na biomassa da raiz também foi encontrada no cultivo *in vitro* de *Alcantarea imperialis* a 15°C constantes e 30°C (dia)/15°C (noite) em relação as plantas crescidas a 30°C constantes (Mollo *et al.* 2011). Esses autores, porém, não fizeram a aclimatização das plantas *in vitro* para verificar se essa relação se manteria.

A Taxa de Crescimento Relativa (TCR) de uma planta ou de qualquer órgão dela é em função do tamanho inicial (Benincasa 2003), podendo ser considerada um índice de eficiência, já que representa a capacidade da planta em produzir material novo. Corroborando os dados já apresentados, a TCR mostrou maior crescimento nas plantas aclimatizadas de T3 da temperatura de 15°C, porém para aquelas de T6 este foi maior nas provenientes do tratamento a 10°C (Tabelas 5 e 6).

A análise de regressão mostrou aumento no crescimento das plantas aclimatizadas em relação à temperatura de cultivo *in vitro* (Figuras 8 e 9). Como mencionado anteriormente, para *Vriesea inflata* foi encontrado comprimento menor da folha de plantas cultivadas *in vitro* a 15°C por dois anos, transferidas para a temperatura de 28°C por um ano e posteriormente aclimatizadas quando comparadas com plantas aclimatizadas da temperatura de 28°C constantes (Pedroso *et al.* 2010). Nesse caso, o tempo de aclimatização foi de três meses e, como para *N. minutum*, a exposição à baixa temperatura não causou aceleração neste período.

Considerando que as plantas de T3 e T6 apresentam idades diferentes, o conteúdo de pigmentos das plantas de T3 se mostrou semelhante, ou até maior, que nas plantas aclimatizadas de T6 (Figura 10). O conteúdo de clorofilas está relacionado com o status nitrogenado das plantas, já que o nitrogênio é um componente essencial da clorofila (Wiedenfeld *et al.* 2009), o que torna estes parâmetros mais um dos que comprovam o efeito benéfico da baixa temperatura *in vitro* previamente utilizada durante três meses. O aumento no conteúdo de pigmentos também foi relatado para ervilhas (*Pisum sativum* L.) quando cultivadas a 4°C e transferidas para 23°C em relação àquelas que foram mantidas a 23°C (Georgieva & Lichtenthaler 2006).

A formação de folhas com coloração verde clara, descrita para as plantas crescidas *in vitro* a 10 e 15°C (apenas aos três meses) (Capítulo 1) não ocorreu com a transferência das plantas para uma temperatura maior, além da porcentagem de folhas pré-existentes com coloração verde clara ter diminuído no decorrer dos 120 dias de aclimatização (Tabela 7). A formação de setores claros prejudica a capacidade fotossintética e reduz a adaptação a mudanças no ambiente (Sun & Wen 2011), sendo que para *N. minutum* essa característica pode ter contribuído para a morte de algumas plantas aclimatizadas da temperatura de 10 e 15°C (Tabela 1).

A coloração verde clara está relacionada com danos causados pela baixa temperatura, como por exemplo, na biogênese e estrutura do cloroplasto (Liu *et al.* 2010, Xu *et al.* 2012) e na fotossíntese, que pode ser reduzida e tornar a folha incapaz de utilizar e de dissipar toda a energia luminosa absorvida, levando ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que induzem ao branqueamento no tecido (chamado em inglês de “photobleaching”) (Close *et al.* 1999). O aumento da temperatura durante a aclimatização provavelmente eliminou ou, ao menos, minimizou estes danos, fazendo com que não houvesse a formação de novas folhas com coloração verde clara além da recuperação da cor verde destas folhas.

De modo geral, os parâmetros analisados para as plantas aclimatizadas obtidas da temperatura de 20°C apresentaram valores maiores ou iguais aos das plantas aclimatizadas provenientes da temperatura controle (25°C). Provavelmente isto ocorreu por que esta condição é a que mais se aproxima do ambiente em que estas plantas ocorrem na natureza, já que a temperatura média no verão da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba é de 21°C (Gutjahr & Tavares 2009). Deste modo, a temperatura de 20°C para *N. minutum* pode ser considerada ideal quando o objetivo não for a redução do crescimento *in vitro*, diferente do observado comumente para outras bromélias, que mostra o uso da temperatura de 25°C (Bencke & Droste 2008, Rech Filho *et al.* 2009, Hung *et al.* 2011, Aoyama *et al.* 2012).

Os principais fatores que podem ser atribuídos para as plantas mortas durante o período de aclimatização das plantas de T3 provenientes da temperatura de 10°C são os menores parâmetros biométricos do sistema radicular e de biomassa de raízes, que como já mencionados, são fatores essenciais para garantir o estabelecimento do crescimento nas condições *ex vitro* (Aoyama *et al.* 2012), além da coloração verde clara das folhas ocasionados pela baixa temperatura *in vitro*. Deste modo, o cultivo *in vitro* por três meses na temperatura de 10°C não é considerada ideal para uma coleção *in vitro* de crescimento lento de *N. minutum*. Portanto, este trabalho sugere o uso da temperatura de 15°C para a formação da coleção *in vitro*, pois as plantas aclimatizadas dessa temperatura apresentaram crescimento

satisfatório durante os 120 dias de aclimatização, mostrando efeito positivo do frio nesse processo, como já relatado para a bromélia *Vriesea inflata* (Pedroso *et al.* 2010).

Analisando as plantas aclimatizadas de T6, foi verificado menor aumento das massas fresca e seca da parte aérea e das raízes e menor TCR naquelas provenientes da temperatura de 15°C quando comparadas com as plantas aclimatizadas de T3 obtidas da mesma temperatura, indicando que este tempo maior *in vitro* não favoreceu o crescimento das plantas durante a aclimatização.

Portanto, o uso da temperatura de 15°C durante o cultivo *in vitro* de *N. minutum* se mostrou eficiente para a aclimatização das plantas. Para um reestabelecimento do crescimento mais rápido, o tempo ideal de permanência *in vitro* antes da transferência *ex vitro* é de três meses.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoyama, E.M.** 2010. Produção *in vitro* e em estufa de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) a partir de sementes. Tese de doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Aoyama, E.M., Versieux, L.M., Nievola, C.C. & Mazzoni-Viveiros, S.C.** 2012. Avaliação da eficiência da propagação de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivada *in vitro* e *ex vitro*. *Rodriguésia* 63 (2): *in press*.
- Bencke, M. & Droste, A.** 2008. Otimização da micropropagação de *Vriesea gigantea* Gaudich. (Bromeliaceae), uma espécie ameaçada de extinção, nativa do Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisas, Botânica* 59: 299-306.
- Benincasa, M.M.P.** 2003. Análise de crescimento de plantas (noções básicas). Funep, Jaboticabal.
- Campostrini, E. & Otoni, W.C.** 1996. Aclimatização de plantas: abordagens recentes. <http://www.cnph.embrapa.br/laborato/biocel/abctp25.htm> (acesso em 04.07.2012).
- Cheyne, V.A. & Dale, P.J.** 1980. Shoot tip culture in forage legumes. *Plant Science Letters* 19: 303-309.
- Close, D.C., Beadle, C.L., Holz, G.K. & Ravenwood, I.C.** 1999. A photobleaching event at the North forest products somerset nursery reduces growth of *Eucalyptus globulus* seedlings. *Tasforest* 11: 59-67.
- Evert, F.R.** 2006. Esau's plant anatomy. John Wiley & Sons, New Jersey.
- George, E.F.** 1996. Plant propagation by tissue culture – Part 2 In practice. 2 ed. Exegetics Limited, London.
- Georgieva, K. & Lichtenthaler, H.K.** 2006. Photosynthetic response of different pea cultivars to low and high temperature treatments. *Photosynthetica* 44 (4): 569-578.
- Grattapaglia, D. & Machado, M.A.** 1998. Micropropagação. *In*: A.C. Torres, L.S. Caldas & J.A. Buso (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, Brasília, v.1, pp. 43-76.
- Gutjahr, M.R. & Tavares, R.** 2009. Clima. *In*: M.I.M.S. Lopes, M. Kirizawa & M.M.R.F. Melo (orgs.). *Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba*. Instituto de Botânica, São Paulo. pp. 39-51.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies Jr., F.T. & Geneve, R.L.** 2002. *Plant propagation: principles and practices*. 7 ed. Upper Saddle River, New Jersey.
- Hazaika, B.N.** 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108: 105-120.

- Hoffmann, A., Chalfun, N.N.J. & Pasqual, M.** 2001. Efeito do ácido giberélico e do frio na sobrevivência e crescimento inicial de plântulas micropropagadas de macieira “Marubakaido”, durante a aclimatização. *Ciência e Agrotecnologia* 25 (1): 31-37.
- Hung, P-L., Liao, L-J., Tsai, C-C. & Liu, Z-H.** 2011. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 73-78.
- Kadleček, P., Tichá, I., Haisel, D., Čapková, V. & Schäfer, C.** 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161: 695-701.
- Lata, H., Moraes, R.M., Bertoni, B. & Pereira, A.M.S.** 2010. *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. *In vitro Cellular & Development Biology – Plant* 46: 22-27.
- la Viña, G., Pliego-Alfaro, F., Driscoll, S.P., Mitchell, V.J., Parry, M.A. & Lawlor, D.W.** 1999. Effects of CO₂ and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 587-595.
- Lichtenthaler, H.K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *In: L. Packer & R. Douce (eds). Methods in enzymology.* Academic Press Inc., London. pp. 350-382.
- Liu, X., Yu, F. & Rodermel, S.** 2010. An Arabidopsis pentatricopeptide repeat protein, SUPPRESSOR OF VARIEGATION7, is required for FtsH-mediated chloroplast biogenesis. *Plant Physiology* 154: 1588-1601.
- Malda, G., Suzán, H. & Backhaus, R.** 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81: 71-87.
- Malik, S., Kumar, R., Vats, S.K., Brushan, S., Sharma, M. & Ahuja, P.S.** 2009. Regeneration in *Rheum emodi* Wall.: A step towards conservation of an endangered medicinal plant species. *Engineering in Life Sciences* 9 (2): 130-134.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1997. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 40: 43-57.
- Mollo, L., Martins, M.C.M., Oliveira, V.F., Nievola, C.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2011. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107 (1): 141-149.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

- Nagel, K.A., Kastenholz, B., Jahnke, S., Dusschoten, D. van, Aach, T., Mühlich, M., Truhn, D., Scharr, H., Terjung, S., Walter, A. & Schurr, U.** 2009. Temperature responses of roots: impact on growth, root system architecture and implications for phenotyping. *Functional Plant Biology* 36: 947-959.
- Negash, A., Krens, F., Schaart, J. & Visser, B.** 2001. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 107-111.
- Pedroso, A.N.V., Lazarini, R.A.M., Tamaki, V. & Nievola, C.C.** 2010. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. *Revista Brasileira de Botânica* 33 (3): 407-414.
- Pereira, J.E.S. & Fortes, G.R.L.** 2000. Desfolheamento e baixa temperatura em plantas micropropagadas de macieira como forma de superar a parada do crescimento durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12 (2): 135-145.
- Pereira, J.E.S., Fortes, G.R.L. & Silva, J.B.** 2001. Efeito da aplicação de baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36 (1): 89-95.
- Rech-Filho, A., Dal Vesco, L.L. & Guerra, M.P.** 2009. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from Atlantic Forest. *Ciência Rural* 39: 909-912.
- 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 Cellular & Development Biology – Plant* 46 (6): 524-529.
- Sun, X. & Wen, T.** 2011. Physiological roles of plastid terminal oxidase in plant stress response. *Journal of Biosciences* 36 (5): 951-956.
- Tadesse, M., Lommen, W.J.M. & Struik, P.C.** 2000. Effects of *in vitro* treatments on leaf area growth of potato transplants during acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 59-67.
- Tamaki, V., Paula, S.M., Nievola, C.C. & Kanashiro, S.** 2011. Soluções nutritivas alternativas para o cultivo de bromélias ornamentais. *O Mundo da Saúde* 35 (1): 91-97.
- Xu, F., Zhang, D., Zhu, F., Tang, H., Lv, X., Cheng, J., Xie, H. & Lin, H.** 2012. A novel role for cyanide in the control of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings response to environmental stress. *Plant, Cell and Environment*. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02531.x.
- Wiedenfeld, B., Wallace, B.W. & Hons, F.** 2009. Indicators of cotton nitrogen status. *Journal of Plant Nutrition* 32: 1353-1370.

CONSIDERAÇÕES FINAIS & PERSPECTIVAS

A bromélia *Nidularium minutum* Mez. é endêmica da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, localizada no Estado de São Paulo. Devido às características de suas folhas e brácteas, apresenta um grande potencial ornamental. Além disso, habita uma área coberta predominantemente pela Mata Atlântica, um bioma altamente ameaçado e está inclusa no Livro Vermelho das Espécies Vegetais Ameaçadas de Extinção, sendo relevantes medidas de conservação para esta espécie.

Neste contexto, o cultivo *in vitro* pode ser utilizado como uma ferramenta para a conservação de espécies vegetais ameaçadas de extinção, sendo que realizado por meio de sementes, garante a viabilidade genética necessária a programas de conservação. Com a redução da temperatura de cultivo, é possível a formação de uma coleção *in vitro* de crescimento lento, diminuindo o espaço e custo laboratorial. Na literatura é descrita a temperatura de 15°C como ideal para o crescimento lento *in vitro* de espécies tropicais. Considerando que *N. minutum* habita uma região que apresenta uma temperatura média de 21°C no verão e 15°C no inverno, acredita-se ser possível a formação de uma coleção *in vitro* de crescimento lento desta espécie por meio da redução da temperatura. Para isto são necessárias avaliações fisiológicas e anatômicas utilizadas para identificar as possíveis adaptações ou sensibilidade ao frio, de modo a verificar a viabilidade de formação da coleção. Contudo, a avaliação da retomada do crescimento dessas plantas quando retiradas dos frascos (aclimatização) e transferidas para condições de crescimento em estufa deve também ser realizada. Desse modo, no presente trabalho foi analisada a sobrevivência, o crescimento da parte aérea e do sistema radicular, o conteúdo de pigmentos fotossintéticos, a anatomia da folha, a produção de carboidratos solúveis e estruturais e a aclimatização de plantas de *N. minutum* de modo a avaliar se suas características morfo-fisiológicas e metabólicas são alteradas durante o cultivo *in vitro* a baixa temperatura, sendo com isso possível reestabelecer o crescimento quando aclimatizadas em uma temperatura maior.

Os resultados obtidos, após três e seis meses de cultivo *in vitro*, mostraram uma elevada sobrevivência das plantas nas temperaturas de 10, 15, 20 e 25°C (Controle), o que indica a tolerância ao frio desta espécie. As características biométricas e de massa apresentaram uma redução no crescimento das plantas, corroboradas pela Taxa de Crescimento Relativo (TCR), sugerindo um atraso no crescimento das plantas em função da menor temperatura de cultivo. Entretanto, não foram constatadas alterações na morfologia das plantas quando mantidas nas baixas temperaturas, tanto aos três como aos seis meses de

cultivo, o que indica a viabilidade do cultivo para *N. minutum* pelo período analisado (seis meses).

O teor de pigmentos fotossintéticos foi menor, após três meses, para as plantas crescidas nas temperaturas de 10 e 15°C quando comparadas com aquelas da temperatura controle. De fato, a coloração verde clara observada nas folhas mais novas pode estar relacionada a esses valores. Além disso, a anatomia foliar mostrou existir uma maior espessura do parênquima aquífero (tecido especializado em armazenar água, no qual não se encontram cloroplastos) e, conseqüentemente, um menor parênquima clorofiliano (região onde se localiza os cloroplastos), resultando, possivelmente, nesta coloração verde clara. Na literatura são mencionadas algumas explicações fisiológicas e bioquímicas para este clareamento nas folhas, como danos ou atrasos na biogênese de cloroplastos, na organização dos fotossistemas I e II, além do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Aos seis meses, não houve a presença desta coloração verde clara nas plantas crescidas a 15°C, que também apresentaram um aumento na espessura do parênquima clorofiliano, fatores que podem ter influenciado no aumento no conteúdo de clorofilas e carotenoides nas plantas mantidas a 15°C, que se tornou semelhante ao daquelas cultivadas a 25°C. Contudo, investigações futuras podem auxiliar na melhor compreensão desse resultado. Uma perspectiva interessante seria verificar a presença de possíveis danos causados na ultraestrutura dos cloroplastos devido a exposição à baixa temperatura. Além disso, analisar os mecanismos antioxidantes que poderiam auxiliar as plantas na adaptação ao frio, como o conteúdo de óxido nítrico, e também da enzima nitrato redutase, que está relacionada com a produção do óxido nítrico.

Um elevado teor de água (acima de 90%) foi encontrado para as plantas cultivadas *in vitro*, estando provavelmente relacionado com a presença do parênquima aquífero, o que pode ter contribuído para garantir a sobrevivência das plantas nas baixas temperaturas, pois na literatura é relatado que o frio leva a uma desidratação das plantas, causando um aumento na permeabilidade da membrana e perda da sua integridade.

Outra adaptação ao frio poderia referir-se ao conteúdo de carboidratos solúveis e estruturais (principalmente dos polissacarídeos pécnicos) que foi maior nas plantas crescidas a 10°C, tanto aos três como aos seis meses, sendo que naquelas mantidas a 15°C houve uma maior quantidade de amido e também de sacarose quando comparada com as plantas crescidas a 10°C. O acúmulo de açúcares como uma proteção ao resfriamento é amplamente documentado na literatura consultada, pois eles contribuem para a estabilização de lipídeos e proteínas da membrana celular durante a desidratação induzida por temperaturas baixas, podendo estes açúcares estar também relacionados com a tolerância de *N. minutum* ao frio. A

presença de açúcares e do amido pode ter influenciado na sobrevivência dessas plantas quando transferidas para as condições *ex vitro*, pois podem ter contribuído para a manutenção da hidratação durante a aclimatização, além de ser uma fonte de energia extra para estas plantas. Por isso, seria importante avaliar se há alterações no acúmulo de carboidratos durante esta fase.

De modo geral, houve um aumento no crescimento das plantas quando aclimatizadas, o que pode ter sido atribuído à influência da baixa temperatura durante o cultivo *in vitro*, sendo descrita na literatura como tendo um efeito positivo durante a aclimatização.

O fato de ter sido observado um número menor de plantas que sobreviveram à aclimatização, provenientes do tratamento prévio *in vitro* à 10°C, pode ser devido a alterações na síntese de clorofilas, pois estas apresentavam uma cor verde clara e menores teores de pigmentos, além da menor quantidade de raízes, tanto em relação à biometria como a massa. Inclusive foi observado, com a partição da biomassa, que as plantas crescidas nesse tratamento apresentam uma menor porcentagem de raiz e uma maior de parte aérea quando comparada com as plantas obtidas dos outros regimes térmicos *in vitro*. Ao serem aclimatizadas, as plantas passam a depender da capacidade das raízes para a absorção de água e nutrientes, sendo por isso relevante a sua presença para o sucesso da aclimatização.

Resultados preliminares mostram que esta coloração verde claro, observada nas folhas mais novas de *N. minutum* quando mantidas a 10°C, permanece mesmo quando são transferidas para esta temperatura plantas com idade maior, como foi observado para aquelas que foram mantidas *in vitro* na temperatura de 25°C por seis meses. Logo, se o objetivo for reduzir o crescimento de plantas mantidas *in vitro* por um tempo prolongado, o uso da temperatura de 10°C irá provocar alterações na coloração das folhas, o que pode não ser benéfico em uma produção de plantas.

O aumento do conteúdo de massas fresca e seca, os maiores valores da TCR e dos pigmentos fotossintéticos ocorreu nas plantas aclimatizadas após três meses de cultivo *in vitro* provenientes da temperatura de 15°C. Após seis meses nessas mesmas condições, as plantas apresentaram uma TCR menor. Logo, é mais favorável para a aclimatização o cultivo *in vitro* das plantas por três meses nessa temperatura, quando o objetivo é a produção de mudas.

Este trabalho mostrou a tolerância de *N. minutum* a condições de temperaturas baixas constantes, como as que são utilizadas em bancos de germoplasma de outras espécies vegetais, podendo citar como exemplo a mandioca e a macieira, e também as espécies ameaçadas *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* e *Cedrus atlantica* Mannetti. Devido as características apresentadas durante o cultivo *in vitro* e a sobrevivência durante a aclimatização, com o uso da temperatura de 15°C foi possível reduzir o crescimento dessas

plantas, sendo que as adaptações originadas pela exposição a baixa temperatura pode ter favorecido o desenvolvimento durante a aclimatização. Logo, é possível manter uma coleção *in vitro* de crescimento lento de *N. minutum* com o uso da temperatura de 15°C por até seis meses, porém o tempo de cultivo *in vitro* de três meses se mostrou mais favorável para a obtenção de mudas durante a aclimatização *ex vitro*.

Este trabalho contribuiu para criar subsídios para a formação de uma coleção *in vitro* de crescimento lento que pode tanto atender a demanda do mercado de plantas ornamentais, contribuindo indiretamente para a redução da retirada dos exemplares existentes no ambiente natural, como providenciando mudas para programas de repovoamento, visto que a bromélia endêmica *N. minutum* consta da lista de espécies ameaçadas de extinção.

RESUMO

Influência de baixas temperaturas no crescimento, conteúdo de carboidratos e aclimatização da bromélia endêmica *Nidularium minutum* Mez. cultivada *in vitro*

O desenvolvimento de estratégias de preservação é importante para espécies ameaçadas como é o caso da bromélia endêmica *Nidularium minutum* Mez. Dentre as metodologias utilizadas, por meio do uso de temperaturas baixas é possível a formação de coleções *in vitro* de crescimento lento, reduzindo os subcultivos. Tendo em vista o potencial ornamental dessa espécie, é importante avaliar a retomada do crescimento das plantas da coleção quando transferidas para cultivo *ex vitro* (aclimatização). O objetivo desse trabalho foi identificar a condição de cultivo *in vitro*, em baixa temperatura, que induza o menor crescimento de plantas de *N. minutum*, mas a partir da qual seja possível a sobrevivência quando aclimatizadas. Para isto, foram investigados parâmetros associados à adaptação ao frio como análise de carboidratos, clorofila e anatomia. Plantas de *N. minutum* germinadas *in vitro* em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) com a metade da concentração dos macronutrientes foram transferidas para câmaras de germinação nas temperaturas de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C e 25°C. Após três (T3) e seis meses (T6) foram avaliados parâmetros biométricos, anatômicos, pigmentos fotossintéticos e conteúdo de carboidratos das plantas mantidas *in vitro*. Posteriormente foi acompanhado o crescimento durante a aclimatização. As plantas mantidas a 5°C não sobreviveram e houve uma redução do crescimento nas plantas cultivadas a 10 e 15°C, sendo que estas plantas apresentaram maior espessura do parênquima aquífero e acúmulo de carboidratos, menor conteúdo de clorofila e coloração verde clara nas folhas, em relação àquelas mantidas a 25°C. Em T6, o teor de clorofilas das plantas crescidas a 15°C atingiu valores iguais aos daquelas mantidas a 25°C. Foi possível aclimatizar as plantas provenientes de todos os tratamentos térmicos. Entretanto, aquelas oriundas de 10°C apresentaram taxas de sobrevivência menores que as demais. Para a formação de uma coleção *in vitro* de crescimento lento dessa espécie a temperatura ideal foi de 15°C, pois houve a redução do crescimento e a sobrevivência durante a aclimatização. As plantas obtidas por esse método podem ser utilizadas para o repovoamento ou disponibilizadas para o mercado de plantas ornamentais, reduzindo, indiretamente, a procura por exemplares na natureza.

Palavras-chave: Bromeliaceae, coleção *in vitro* de crescimento lento, condições *ex vitro*, pectinas, parênquima aquífero, clorofila.

Influence of low temperatures on growth, carbohydrate content and acclimatization of endemic bromeliad *Nidularium minutum* Mez. cultivated *in vitro*

ABSTRACT

The development of conservation strategies is important for threatened species such as the endemic bromeliad *Nidularium minutum* Mez. Among the methodologies used, through the use of low temperatures is possible to form *in vitro* collections under slow growth, reducing subcultures. Considering the ornamental potential of this species, it is important to evaluate the growth resumption of plants obtained from the collection when transferred to *ex vitro* cultivation (acclimatization). The aim of this study was to identify the *in vitro* condition, at low temperature, which induces the lower growth of *N. minutum* plants, but from which is possible survival when acclimatized. For this, we investigated parameters associated with cold adaptation such as carbohydrates analysis, chlorophyll and anatomy. Plants of *N. minutum* germinated *in vitro* on Murashige & Skoog (1962) with half the concentration of macronutrients were transferred to germination chambers at temperatures of 5°C, 10°C, 15°C, 20°C and 25°C. After three (T3) and six months (T6) the biometric and anatomical parameters, photosynthetic pigments and carbohydrate content of plants grown *in vitro* were evaluated. The growth was accompanied during acclimatization. The plants cultivated at 5°C did not survive and there was a growth decrease in plants grown at 10 and 15°C, and these plants had thicker parenchyma and accumulation of carbohydrates, lower contents of chlorophyll and light green colored leaves, compared to those kept at 25°C. At T6, the chlorophyll content of plants grown at 15°C reached values equal to those maintained at 25°C. It was possible to acclimatize plants from all thermal treatments. However, those from 10°C had lower survival rates than the others. For the formation of an *in vitro* collection of slow growth of this species the optimal temperature was 15°C, since there was a reduction in the growth and survival during acclimatization. The plants obtained by this method can be used for restocking or made available to the ornamental plants market, reducing indirectly the demand of individuals from nature.

Keywords: Bromeliaceae, *in vitro* collection of slow growth, *ex vitro* conditions, pectins, aquiferous parenchyma, chlorophyll.